



**INSTITUTO LATINO - AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**EFEITO DO IPRODIONA (ROVRAL®) NO DESENVOLVIMENTO DE
*GALLUS GALLUS***

BEATRIZ MITIDIERO STACCHISSINI ARCAIN

**FOZ DO IGUAÇU
2017**



**INSTITUTO LATINO - AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

EFEITO DO IPRODIONA (ROVRAL®) NO DESENVOLVIMENTO DE *GALLUS GALLUS*

BEATRIZ MITIDIERO STACHISSINI ARCAIN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Antônio Chiba de Castro

FOZ DO IGUAÇU
2017

BEATRIZ MITIDIERO STACCHISSINI ARCAIN

EFEITO DO IPRODIONA (ROVRAL®) EM *GALLUS GALLUS*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade
UNILA

Profa. Dra. Danúbia Frasson Furtado
UNILA

Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de dezembro de 2017.

Dedico este trabalho aos seres iluminados que fizeram parte de minha caminhada, àqueles a quem chamo, com imenso carinho, de “família”, “amigo” e “professor”.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à minha orientadora por toda a caminhada até aqui, pela paciência, dedicação, didática, diálogos (sejam eles acadêmicos ou cotidianos), oportunidades e a extrema competência, que me possibilitou amadurecimento em diversos âmbitos de meu ser, assim como este maravilhoso Trabalho de Conclusão de Curso. Sem a sua coragem e insistência, esse trabalho não teria finalizado.

Agradeço ao meu coorientador por estar presente, por todo o trabalho e pela paciência em me explicar as análises. Sendo sincera, sou horrível em análises estatísticas. Obrigada por tudo!!

Agradeço às minhas companheiras de laboratório Victoria e Scarlatt por todo o trabalho, companheirismo, erros e esquecimentos. Agradeço também à Ingridy por nos ajudar a encontrar os ovos, também pelas conversas e diversão. Espero poder trabalhar com vocês de novo, foram momentos muito agradáveis.

Agradeço a todos os professores por compartilhar conhecimentos e experiências, algumas vezes como nossos amigos, pelo socorro quando precisávamos, por aquecer o coração e subir aquele décimo, pelos momentos de lazer, as risadas, a sinceridade, a rigidez.

Agradeço também meus professores do ensino infantil, fundamental e médio, principalmente a professora Jane, que me mostrou quão lindo é o mundo da Biologia.

Agradeço aos técnicos de laboratório, que sempre nos auxiliaram de bom grado durante as aulas e projetos. Aos bons laços que criamos dentro de um simples laboratório, muito obrigada.

Agradeço a professora Danúbia pela dedicação e amizade. Por ter me dado a oportunidade de começar a crescer dentro da universidade. Pelas boas bordoadas que mereci, pela sinceridade e as risadas. Por ser minha primeira orientadora.

Agradeço aos meus amigos que amo e que não puderam estar fisicamente presentes em minha estadia em Foz. Roberto, Dâmaris, Stefanny e Marcos, vocês são os melhores amigos que eu poderia ter. Agradeço todo apoio que vocês me deram desde o ensino fundamental e médio, pela diversão, as dores de cabeça, as confusões, o carinho e, principalmente, por existirem na minha vida. Obrigada ao cunhadinho Vinicius, por cuidar tão bem da Dam e agora do Ben.

Obrigada a Ci e Gabi pelo lar quando recém cheguei a Foz.

Agradeço aquelas que me ajudaram a amadurecer espiritualmente e tirar de mim aquele conservadorismo enraizado pela criação. São elas a que meu coração mais dói de saudade: Lara, Maria Noel e Katha.

Agradeço aos outros companheiros da universidade, que me acompanharam até aqui e que levarei boas lembranças: Raquel, Vitória, Will, Samy, Giuli (marry me!!), Mariana Menezes, Mariana Gabriele, Pili, Fares, Alice, Jerson, Agnes, Leila, Renata, Marina Auricchio, Marina de la Barrera, Karina, Angelita, Lucía, Diana (obrigada por cuidar do Hippie), Babi, Marcia, Crovella, Rodrigo Lima, Cintia (também pela surpresa agradável de ser citada no seu TCC), Fatty, Fatima, Licet, Fede, Glenda, Samu, Camila Duarte, Cristiane, Camila py, Patricio, Sabrina, Diego, Elizabeth, Sanney, Nathália, Gustavo, Larissa, Jéssica Jeziorny, Jennifer, Joseth, Kristhy, Beatriz e Denise.

Obrigada ao pessoal que sempre estava no laboratório de biodiversidade e que fizeram desse mês que passei lá momentos mais movimentados (Ciça, Mariana Cristina, Adrieli, Sara, Maria Carolina, Marcos, Cláudia, Josi, Manu).

Agradeço ao Ricardo pela companhia; os porres foram mucho locos e eu ainda tenho problemas com a canelinha...

Agradeço a Belén pela sinceridade e por estar ao meu lado quando mais precisei. O mesmo para a Betânia e também por me dar muita força para terminar o TCC. Vocês duas são pessoas que jamais esquecerei...

Ao Jhon, Gu, Cris e agora Ahmed, por deixarem eu parasitar a casa de vocês sempre, assim como o Pedro.

Agradeço às minhas companheiras de casa Sara e Jéssica por todo carinho e companheirismo. Também a Juliana, uma irmã de alma que encontrei tarde na graduação e que considero muito. Que nossas despedidas nunca sejam um “adeus”.

Agradeço em especial a Mariana Motta, Ricardo (de novo), Alejandra e Júlia pela ajuda em algo no meu TCC.

Motta, você é uma pessoa super especial com um coração maravilhoso e eu fico muito feliz de ser sua amiga e compartilhar momentos. Espero que isso perdure infinitamente.

Agradeço a Mica, por aleatoriamente aparecer durante esse período, pelas piadinhas de TCC, por se importar e ter me dado forças de longe.

Agradeço a Gé, Karen e Jannie pela amizade e pelos domingos de vinho, pipoca, cervejas e espetinhos.

Agradeço aos meus amigos de World of Warcraft: Deise, Beta, Pyerry, Xaxi, Deo, Thy (e a mana Cin), Chris, Tuy (Moni e Max), Haoh, Pedrin e irmãos Yama. Muito obrigada Deo e Thy, por me apresentarem à minha segunda mãe do coração.

Agradeço a Itaipu pelo estágio, outro grande marco para meu amadurecimento. Obrigada a todo o pessoal do Refúgio Biológico. Ao pessoal do Horto de Plantas Medicinais, eu sentirei muita falta de vocês. Obrigada pelos ensinamentos, as conversas e a diversão. À minha supervisora, eu espero encontrar líderes tão incríveis quanto você, que preza por todos e pelo seu trabalho, pela paciência, iniciativa e empatia. São tantas qualidades que observei durante um ano, que não poderia escrever aqui. Obrigada por toda a atenção e oportunidade.

Agradeço a Suzana por me doar o gato mais lindo, fofo, estressado, bagunceiro, mal-humorado, louco, preguiçoso, folgado e reclamão do mundo. Agradeço ao meu gato por ser tudo isso e me fazer companhia.

Agradeço aos meus pais, que amo tanto, por todo apoio, confiança, amor, carinho, preocupação, subsídio, socorro, atenção. Às minhas irmãs de alma, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e ajudando, aquelas que eu procurava antes mesmo que meus pais e que também são minhas melhores amigas. Ao meu cunhadinho. À vovó Tereza e tia Sandra por todo amor, preocupação e dinheirinho no final do mês sempre que dava. Ao meu falecido avô Rada, eu não tenho nem palavras e lágrimas para demonstrar a falta que você nos faz aqui na Terra e o quanto você era importante em nossas vidas. Obrigada por transbordar de amor por nós, vovô... Aos meus avós Carmen e Zé por cuidarem de mim. Aos meus tios, tias, primos e primas, eu amo vocês imensamente.

Obrigada a UNILA pela oportunidade e experiência.

Obrigada aqueles que me fizeram qualquer tipo de dano. Pessoas como vocês fazem com que eu valorizasse ainda mais todas essas outras as quais agradei anteriormente.

Obrigado Google, Sci-Hub, Central de Mangás, Anime FLV, Cine Cataratas, Subway, Netflix, aos drives que me salvaram, Microsoft Office, restaurante Madera, Coca Cola, Facebook, Whatsapp e demais que não lembro no momento.

No caso de sua existência, agradeço a Deus por tudo isso.

Aos que não tive muito contato, mas que me proporcionaram boas risadas, meus agradecimentos.

Agradeço aos demais que esqueci e que vocês não tenham um coração peludo.

Mande notícias do mundo de lá
Diz quem fica
Me dê um abraço, venha me apertar
Tô chegando
Coisa que gosto é poder partir
Sem ter planos
Melhor ainda é poder voltar
Quando quero

Todos os dias é um vai-e-vem
A vida se repete na estação
Tem gente que chega pra ficar
Tem gente que vai pra nunca mais
Tem gente que vem e quer voltar
Tem gente que vai e quer ficar
Tem gente que veio só olhar
Tem gente a sorrir e a chorar
E assim, chegar e partir

São só dois lados
Da mesma viagem
O trem que chega
É o mesmo trem da partida
A hora do encontro
É também de despedida
A plataforma dessa estação
É a vida desse meu lugar
É a vida desse meu lugar
É a vida

(Fernando Brant e Milton Nascimento)

ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini. **Efeito do Iprodiona (Rovral®) em *Gallus gallus***. 2017. 87 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

RESUMO

Os agrotóxicos representam um importante fator de risco à saúde humana e ao meio ambiente. Os países em desenvolvimento representam 30% de todo o mercado global consumidor de agrotóxicos e algumas substâncias já proibidas em países europeus ainda são utilizadas amplamente em países da América Latina, apresentando grande risco à saúde da população que trabalha e vive nas proximidades, bem como para o meio ambiente e animais da região. O iprodiona (Rovral®) é um fungicida de contato amplamente utilizado na lavoura de café, tomate, feijão, entre outros, cujos efeitos embriotóxicológicos são pouco conhecidos. O presente trabalho teve por objetivo investigar o papel do iprodiona (Rovral®) sobre o desenvolvimento embrionário normal de embriões de galinha. Para esse fim, embriões de galinha foram submetidos a tratamento com o agrotóxico por injeção em diferentes concentrações, e foram depois analisados quanto a alterações na mortalidade e morfologia, buscando compreender de que forma podem ser afetados os mecanismos normais do desenvolvimento embrionário. Através de experimentos com diferentes concentrações de iprodiona e por estimativa através da equação da reta, estabelecemos a dose letal média (LD₅₀) em aproximadamente 100 µL/mL. Os embriões que sobreviveram aos tratamentos apresentaram peso e desenvolvimento normal, porém algumas malformações apareceram durante o estudo, sendo as mais frequentes diferença ocular e hemorragias. Conforme análise estatística da morfometria, embriões tratados com iprodiona a 93,3 µL/mL tiveram olhos do lado direito significativamente menores que os controles. Além disso, os membros superiores dos embriões tratados com 93,3 µL/mL e 100 µL/mL de iprodiona apresentaram assimetria bilateral significativa. Os resultados observados podem ser utilizados para esclarecer os riscos que esse defensivo agrícola representa ao meio ambiente, bem como clarear o entendimento do seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário humano, uma vez que as vias que regulam o desenvolvimento animal são amplamente conservadas.

Palavras-chaves: Agrotóxico. Iprodiona. Rovral®. Fungicida. Embriotoxicidade.

ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini. **Efecto del Iprodiona (Rovral®) en *Gallus gallus***. 2017. 87 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

RESUMEN

Los agrotóxicos representan un importante factor de riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Los países en desarrollo representan el 30% de todo el mercado mundial consumidor de agrotóxicos y algunas sustancias ya prohibidas en países europeos todavía se utilizan ampliamente en países de América Latina, presentando un gran riesgo para la salud de la población que trabaja y vive cerca, así como para el medio ambiente y los animales de la región. El iprodiona (Rovral®) es un fungicida de contacto ampliamente utilizado. en el cultivo de café, tomates, frijoles, entre otros, cuyos efectos embriotoxicológicos son poco conocidos. El presente trabajo tuvo por objetivo investigar el papel del iprodiona (Rovral®) sobre el desarrollo embrionario normal de embriones de gallina. Para ese fin, embriones de gallina fueron sometidos a tratamiento con el agrotóxico por inyección en diferentes concentraciones, y luego fueron analizados en cuanto a alteraciones en la mortalidad y morfología, buscando comprender de qué forma pueden ser afectados los mecanismos normales del desarrollo embrionario. A través de experimentos con diferentes concentraciones de iprodiona y por estimación a través de la ecuación de la recta, establecemos la dosis letal media (LD₅₀) en aproximadamente 100 µL/mL. Los embriones que sobrevivieron a los tratamientos presentaron peso y desarrollo normal, pero algunas malformaciones aparecieron durante el estudio, siendo las más frecuentes diferencia ocular y hemorragias. Conforme el análisis estadístico de la morfometría, embriones tratados con iprodiona a 93,3 µL/mL tuvieron ojos del lado derecho significativamente menores que los controles. Además, los miembros superiores de los embriones tratados con 93,3 µL/mL y 100 µL/mL de iprodiona presentaron una asimetría bilateral significativa. Los resultados observados pueden ser utilizados para aclarar los riesgos que este medio agrícola representa, y aclarar el entendimiento de su efecto sobre el desarrollo embrionario humano, ya que las vías que regulan el desarrollo animal se conservan ampliamente.

Palabras clave: Agrotóxico. Iprodiona. Rovral®. Fungicida. Embriotoxicidad.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 AGROTÓXICOS.....	12
1.2 AGROTÓXICOS: EFEITOS SOBRE A SAÚDE.....	13
1.3 AGROTÓXICOS: EFEITOS SOBRE O AMBIENTE E BIODIVERSIDADE.....	21
1.4 O IPRODIONA E SEUS EFEITOS SOBRE ORGANISMOS VIVOS.....	29
1.5 EMBRIOTOXICIDADE DO IPRODIONA EM EMBRIÕES DE AVES.....	30
 2 OBJETIVOS.....	 33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
 3 METODOLOGIA.....	 34
3.1 TRATAMENTO DOS OVOS NO DIA 0.....	34
3.2 COLETA E FIXAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	35
3.2.1 Paraformaldeído (PFA) 4%.....	35
3.2.2 Tampão fosfato-salino (PBS) 10x (10 vezes concentrado).....	36
3.2.3 Carnoy.....	36
3.2.4 Procedimento e fixação.....	36
3.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS.....	37
3.4 ANÁLISE DE DADOS.....	37
 4 RESULTADOS.....	 40
4.1 ENCONTRANDO A LD ₅₀	40
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES TRATADOS COM IPRODIONA EM SUA LD ₅₀	44
4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE EMBRIÕES TRATADOS COM IPRODIONA EM SUA LD ₅₀	49
 5 DISCUSSÃO.....	 52
 6 CONCLUSÃO.....	 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	71
ANEXO A.....	72
ANEXO B.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

A partir dos anos 1950, com a Revolução Verde, houve uma mudança no trabalho agrícola, através do uso extensivo de agentes químicos (ou agrotóxicos) para controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra pragas, segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA). No Brasil, os agrotóxicos foram utilizados inicialmente para programas de saúde pública no combate e controle de vetores e parasitas e, na década de 1960, iniciou-se a utilização intensiva para a agricultura (OPAS/OMS, 1996). A Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, define agrotóxicos e afins como “produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”, excluindo fertilizantes e produtos químicos administrados a animais para estimulação do crescimento ou modificação do comportamento reprodutivo.

Processos avaliativos e classificatórios dos agrotóxicos são realizados a partir de órgãos nacionais de competências estabelecidas na Lei nº 7.802 de 11 de julho 1989 e no Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (Rebello et al., 2010). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo Art. 5º do Decreto nº 4.074/2002, tem por função avaliar a eficiência agronômica dos agrotóxicos e afins para utilização em setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, em florestas plantadas e pastagens, concedendo o registro, incluindo o Registro Especial Temporário, para os usos citados anteriormente, atendendo as diretrizes e exigências dos Ministérios da Saúde (MS) e do MMA. Atualmente, o MAPA fiscaliza estes agrotóxicos – sua produção, importação, exportação, produtos, coletas de amostras, estações credenciadas de pesquisa, entre outros - através da Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas da Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS-MAPA) (MAPA, 2016).

O MS avalia a toxicidade dos agrotóxicos, sua classificação, a fixação de limites máximos de resíduos – que são encaminhados posteriormente à Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária -, a segurança dos aplicadores destes produtos e da população em geral (segundo a Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992). Além disso, segundo o Art. 7º do Decreto

nº 4.074/2002, cabe ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), uma autarquia federal vinculada ao MMA, a função das análises, registros e controle de substâncias químicas, agrotóxicos e afins. Para realizar esta função, o IBAMA conduz a Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) baseando-se nas características do produto, como propriedades físico-químicas e toxicidade, visando os variados organismos encontrados na natureza, a acumulação em tecidos vivos, persistência no ambiente, deslocamento no solo, ar ou água e enfermidades, como mutações, câncer, malformações em fetos ou embriões e problemas na reprodução de animais (Rebelo et al., 2010).

Levando em conta os parâmetros de transporte, persistência, bioconcentração e ecotoxicidade já citados, o IBAMA classifica os agrotóxicos em Classe I (Produto altamente perigoso ao meio ambiente), Classe II (Produto muito perigoso ao meio ambiente), Classe III (Produto perigoso ao meio ambiente) e Classe IV (Produto pouco perigoso ao meio ambiente) (IBAMA, 2009).

Os agrotóxicos são classificados como inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), bactericidas (controle de bactérias do solo), rodenticidas (controle de roedores), nematocidas (controle de nematoides) e acaricidas (controle de ácaros) (Ribas & Matsumura, 2009).

Em 2009, o Brasil atingiu o marco em ser o maior consumidor mundial de agrotóxicos, chegando a US\$ 8,5 bilhões em vendas de agrotóxicos no ano de 2011¹.

1.2 AGROTÓXICOS: EFEITOS SOBRE A SAÚDE

Atualmente, o Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (Sinitox), criado em 1980 pelo MS, com sede na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), coordena o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação humana registrados no Brasil pela Rede Nacional de Centros de Controle de Intoxicações (Rede Sinitox). Dados de 1998 da Rede Sinitox demonstraram que a faixa etária de 20 a 29 anos correspondeu a de maior número de casos de intoxicação por pesticidas agropecuários e a de 30 a 39 anos foi a segunda mais atingida, representada pela maioria dos trabalhadores ativos.

¹ Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para defesa agrícola – SINDAG, 2011

Ao comparar também as ocorrências quanto ao sexo, casos de intoxicações por químicos industriais e pesticidas agropecuários, assim como óbito por agentes químicos, acometeram mais indivíduos do sexo masculino (OMS, 1990).

Entretanto, Marques et al. (1993) aclaram que estas estatísticas não refletem a realidade dos casos de intoxicação nacional, pois o número de centros é insuficiente para a extensão territorial nacional, a notificação das vítimas ou familiares não é feita de maneira correta para contabilizar o caso e, na maioria das vezes, há busca pelo atendimento em rede pública de saúde, onde o registro junto aos centros não é realizado. Adicionalmente, dados coletados pelos Centros de Controle de Intoxicações - uma instituição inexistente em diversas regiões produtoras ou de difícil acesso para populações rurais - são enviados de modo descontínuo ao Sinitox, e este possui ausência de informatização. Apesar destes problemas citados, os Centros são os únicos a coletar dados nacionais sobre registros de intoxicações e envenenamentos em seres humanos (Brasil, 1989; Moreira et al., 2002).

A exposição accidental aos agrotóxicos é comum, sendo o número de casos muito maior do que relatado em consequência da falta de notificações. Alguns casos de desastres de grandes proporções foram relatados, como o de Bhopal, na Índia em 1984, onde a exposição ao isocianato de metila contaminou meio milhão de pessoas e levou a óbito 25 mil pessoas até agora (The Bhopal Medical Appeal, 2014). Outro acidente com 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina em 1976, na Itália, ocasionou a intoxicação de 32 mil pessoas e a morte de 459 pessoas (Ribas & Matsumura, 2009).

No Brasil, foi reportado um caso de uma pulverização irregular ocorrida a 15 metros da Escola Rural de São José do Pontal, em Goiás, por um avião pulverizador da empresa Aerotex Aviação Agrícola contendo o inseticida Engeo Pleno da Syngenta atingindo diretamente crianças e professores (G1, 2013; Éboli, 2013). Por apresentarem sintomas de intoxicação, os atingidos foram levados ao hospital e os demais alunos e funcionários foram dispensados das atividades e a escola fechada, uma vez que o local ainda poderia estar contaminado. Além da irregularidade em aplicação próxima a locais com pessoas, o agrotóxico utilizado só poderia ser aplicado via terrestre. Até o mês de outubro do ano de 2013, seis meses depois, as vítimas ainda apresentavam sintomas de intoxicação. Em 2016, o Ministério Público Federal em Goiás ofereceu ação contra as empresas envolvidas, porém as vítimas ainda não foram devidamente indenizadas (Túlio, 2016). Em 2008, a empresa Servatis foi responsável por contaminar o Rio Paraíba do Sul, próximo à Resende, com 10 mil litros de endosulfan de sua

fábrica, contaminação que chegou até o rio Guandu ocasionando um grande impacto social, pois este rio abastece nove milhões de pessoas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Em 2012, a empresa assinou um Termo de Ajustamento de Conduta e deixou de produzir 13 tipos de agrotóxicos (G1, 2008; Folha de São Paulo, 2012).

Moreira et al. (2002) citam em seu trabalho as três vias principais responsáveis pela contaminação humana direta por agrotóxicos: a ocupacional, ou seja, contaminação de trabalhadores que manipulam os agrotóxicos desde sua formulação até a colheita, sendo responsável por 80% dos casos de intoxicação; a via ambiental, pela contaminação dos diversos componentes do meio ambiente os quais utilizamos, como a água, atmosfera e solo; e a via alimentar, através da ingestão de produtos contaminados.

No Brasil, as causas de intoxicação são, primeiramente, por medicamentos, seguidas de agrotóxicos e, dentre estes, a maior incidência de mortes é entre trabalhadores que estiveram em contato com esses produtos químicos (ANVISA, 2009). Entretanto, Miranda et al. (2007) expõem que a contaminação ambiental e os resíduos de agrotóxicos afetam não somente as populações próximas ao cultivo como também os moradores urbanos, através dos alimentos.

Segundo Pimentel et al. (1993) e Stoppelli & Magalhães (2005), alimentos como frutas e legumes possuem presença de agrotóxicos em suas cascas e são os mais contaminados por receberem maiores dosagens. Tendo conhecimento disto, as autoridades competentes necessitam certificar esses alimentos quanto à sua qualidade e verificar a presença de resíduos de agrotóxicos. Assim, análises são realizadas e podem indicar o uso de agrotóxicos impróprios para determinada cultura. No caso de alguns químicos, por não haver registro de uso, o seu limite de tolerância em relação à cultura é desconhecido.

Os limites máximos que um alimento pode apresentar de resíduos de agrotóxicos são estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e OMS. Essa análise é realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos, criado em 2001 para cumprir o decreto nº 4.074/02 e a Resolução da Diretoria Colegiada nº 44/00. Dos nove produtos analisados neste primeiro ano de funcionamento (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), o morango foi o que apresentou maior índice de contaminação, com resíduos dos agrotóxicos azoxistrobina, captana, diclorvós, dicofol, dimetoato, ditiocarbamatos, endosulfan, fentiona, forato, iprodiona,

pirazofós, procimidona, procloraz, tetradifona e vinclozolina, algumas vezes encontrando cinco diferentes agrotóxicos em uma mesma amostra. O tomate, maçã e mamão também apresentaram altos níveis de contaminação; laranja, batata e banana baixos níveis; e a cenoura não apresentou nível de contaminação (Stoppelli & Magalhães, 2005).

Informações sobre agrotóxicos e seus efeitos na saúde podem ser encontrados no site da empresa NORTOX (2015), que disponibiliza diversas bulas informando acerca dos agrotóxicos utilizados pela empresa. Por exemplo, os efeitos agudos e crônicos em seres humanos causados pelo glifosato, um organofosforado amplamente utilizado na agricultura, são disponibilizados pelo site NORTOX nas bulas do glifosato 480 BR e glifosato 480 SL. Em caso de ingestão, são observados sintomas como lesões ulcerativas, epigastria, vômitos, cólicas, diarreia e, ocasionalmente, íleo paralítico e insuficiência hepática aguda; podem ocorrer ainda alterações na pressão sanguínea, palpitações, choque hipovolêmico, pneumonite, edema pulmonar não cardiogênico, insuficiência renal por necrose tubular aguda, cefaleia, fadiga, agitação, sonolência, vertigem, alterações do controle motor, convulsões e coma, além de acidose metabólica. Em casos de exposição cutânea, são observados dermatite de contato (eritema, queimação, prurido e vesículas), eczema e fotossensibilização (eritema, queimação, prurido e vesículas de aparecimento tardio), sendo que esses sintomas podem ser agravados por uma infecção bacteriana secundária. Quando há exposição ocular, os sintomas vão de irritação, dor e queimação ocular, até turvação da visão, conjuntivite e edema na pálpebra. Nas exposições respiratórias, pode ocorrer aumento da frequência respiratória, broncoespasmo e congestão vascular pulmonar.

A Organização Mundial da Saúde - OMS (1990) cita ainda mais efeitos na saúde humana dependendo do tipo de pesticida. Por exemplo, paraquat, captafol, 2,4D e mancozebe podem ocasionar dermatite de contato. Barban, benomil, diclorodifeniltricloroetano (DDT), lindano, zineb e malation podem ocasionar sensibilização da pele, reações alérgicas e erupção cutânea. Benomil, zineb e hexaclorobenzeno podem ocasionar também reações alérgicas. Pesticidas organoclorados podem causar cloracne, lesões no sistema nervoso central, assim como os organomercúrios. Organofosforados podem ocasionar neurotoxicidade atrasada, mudanças no comportamento, lesão no sistema nervoso central e neurite periférica. Clorofenóis e piretróides podem causar neurite periférica.

Os agrotóxicos possuem três tipos de efeitos na saúde humana: efeitos agudos, resultantes de exposição a altas concentrações de um ou mais agentes tóxicos, ocorrem

de forma rápida e aparecem em poucos minutos até 24h, resultando em alterações no estado de saúde. Os efeitos agudos podem ocorrer de forma leve, moderada ou grave, que dependem da quantidade da substância absorvida, do tempo de absorção, da toxicidade da substância e o tempo entre a exposição e o atendimento médico. Os efeitos subagudos, pela exposição moderada ou pequena a produtos tóxicos ou medianamente tóxicos e possui um aparecimento mais lento. E os efeitos crônicos, resultantes de exposição repetida de doses relativamente baixas de um ou mais produtos, normalmente ocorrendo durante longos períodos de tempo (OPAS/OMS, 1996; MS, 2006; Ribas & Matsumura, 2009). Segundo Edwards (1993), na década de 90 era estimada a ocorrência de 850 mil a 1,5 milhões de casos de envenenamento por pesticidas por ano e entre três mil e vinte mil mortes por ano. Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1990, estimava que ocorriam cerca de três milhões de casos de intoxicações agudas anualmente e duzentas mil mortes, considerando a produção de dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. Segundo dados da Organização Internacional do Trabalho (OIT) e da OMS, nos anos 2000, o uso de pesticidas no setor agrícola causa cerca de 70 mil mortes no mundo por intoxicação/ano e ao menos 7 milhões de doenças agudas e de longo prazo não fatais (OIT/OMS, 2005).

O contato diário com agrotóxicos pode causar alterações gradativas caracterizadas por sintomas de intoxicações crônicas, como efeitos neurotóxicos, neuropatias periféricas, alterações no cromossomo, dermatites de contato, alergias, lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais, asma, hipersensibilidade, cânceres, teratogêneses, entre outros (OPAS/OMS, 1996). Soares et al. (2003) fizeram um estudo em nove cidades de Minas Gerais – Teófilo Otoni, Guidoal, Guiricema, Montes Claros, Paracatu, Piraúba, Tocantins, Ubá e Uberlândia - uma relação entre o trabalho rural e fatores de riscos associados com agrotóxicos. Neste estudo, verificou-se que a maioria dos entrevistados utilizavam vários tipos de agrotóxicos, sendo que dos 1.379 agrotóxicos aplicados, 76% eram altamente tóxicos, classificados como Classe I, 3% nível de toxicidade médio, ou seja, Classe II e 3% pouco tóxico, Classe III. Cerca de 979 (71%) eram do tipo organofosforado, 120 (9%) carbamatos e 260 (19%) outros; 15 (1%) dos trabalhadores afirmaram não saber o tipo de agrotóxico utilizado. 482 (45%) dos trabalhadores afirmaram manter contato direto com os agrotóxicos, 45 (4,2%) contato indireto e 44 (4,1%) não manter contato tanto direto como indireto. Neste estudo verificou-se que 50,3% dos indivíduos estavam ao menos moderadamente intoxicados, isto é, apresentavam 75% ou menos atividade de colinesterase, uma enzima responsável por degradar acetilcolina, um neurotransmissor responsável por controlar impulsos nervosos para os

músculos, apontando um alto grau de risco de agravamento à saúde quando algumas situações ocorrem como trabalhar desprotegido, orientação mediante vendedor, uso de organofosforados ou carbamatos.

Foi reportada uma relação entre intoxicação crônica por pesticidas e riscos de doenças respiratórias crônicas, como asma. Essas intoxicações geralmente estavam associadas à aplicação dos pesticidas, a mistura dos químicos, o uso dos equipamentos de limpeza, lavagem de roupas contaminadas e trabalhar em mais de uma fazenda (Faria et al., 2005).

Alterações genéticas podem ser observadas em pessoas submetidas ao contato contínuo com agrotóxicos. Nos Estados Unidos, estima-se que aproximadamente de 6.000 a 10.000 casos de cânceres estão associados ao uso de agrotóxico, sendo eles de pulmão, mama, testículos, tireoide, próstata, ovário e sistema hematopoiético (Pimentel, 1996). Pacheco & Hackel (2002) realizaram um estudo com trabalhadores agrícolas de Passo Fundo - RS, e observaram uma elevada frequência de micronúcleos nos trabalhadores expostos a agrotóxicos, sendo de 14,3/mil células, o dobro da população controle de 7,1/mil células. Segundo Jaga (2000), ocorrências de câncer de mama estão sendo associados ao uso de DDT e organoclorados, pois estes agrotóxicos possuem estrutura química semelhante à molécula de estrogênio. Assim, esses agrotóxicos atuam como falsos hormônios, contaminando as demais células no corpo. Meyer et al. (2003) observou em sua pesquisa na região Serrana do Rio de Janeiro que, de 1979 a 1998, houve 3.871 mortes de trabalhadores rurais, sendo 10,6% (410) devido ao aparecimento de cânceres no estômago, esôfago, pulmão, laringe, cavidade oral, próstata, leucemia, fígado, pâncreas, cérebro e cólon. No período de 1985 a 1990, Koifman et al. (2002) também observaram casos pelo Brasil de cânceres de mama, ovário e próstata em grupos expostos a agrotóxico. Fehlberg et al. (2003) entrevistaram agricultores familiares da zona rural do Vale de São Lourenço - ES e relacionaram dados histórico-familiares e aspectos socioculturais relacionados ou não à utilização, manuseio e tipos de agrotóxico. Em sua pesquisa, a maior frequência de casos de câncer (90%) é de relatos de casos, sendo que 66,6% ocorreram em mulheres, com 50% de casos de câncer uterino. Donna et al. (1984) encontrou associação entre a exposição a herbicidas e câncer de ovário em mulheres (60 casos). Alavanja et al. (2003) reportou uma incidência de câncer de próstata em 566 aplicadores de agrotóxicos (de 55.332 sem história de câncer de próstata) de 1993 a 1999, sendo que os índices de câncer de próstata aumentavam conforme a idade e em casos onde havia incidência de câncer de próstata no histórico familiar. Em outro estudo, pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de pequenas células em estágio extensivo foram entrevistados quanto a exposição de

agrotóxicos (considerando como expostos aqueles com índice maior que 2.400 h) e a superexpressão da oncoproteína *HER-2/neu*. Foram identificados 57 de 193 pacientes com superexpressão de *HER-2/neu*, onde 41 foram expostos a pesticidas. Os autores deste estudo descobriram que pacientes com exposição prévia a pesticidas apresentaram maior risco de superexpressão de *HER-2/neu* (Potti et al. 2003).

Além dos efeitos fisiológicos e genéticos, já foi reportada uma associação entre intoxicação por agrotóxicos e transtornos psiquiátricos menores, reforçados pela intoxicação aguda e o uso de remédios psiquiátricos por parte dos entrevistados (Faria et al., 1999). Segundo a ANVISA (2008), a exposição aos organofosforados está relacionado com desordens psiquiátricas, como depressão, déficit cognitivo e Parkinson. A intoxicação crônica dos organofosforados pode causar distúrbios neurocomportamentais como insônia, sonambulismo, sono excessivo, ansiedade, reações retardadas, dificuldade de concentração e várias sequelas neuropsiquiátricas, labilidade emocional, distúrbios de linguagem, apatia, irritabilidade, alucinações, delírios, tremores, reações esquizofrênicas, alterações no eletroencefalograma, neuropatia periférica, parestesias, hiporreflexia, deficiência na coordenação neuro-motora e depressão. Já os efeitos agudos estão relacionados a inibição da enzima acetilcolinesterase e consequente acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, afetando o Sistema Nervoso Central (SNC), levando a distúrbios do sono, dificuldade de concentração, comprometimento da memória, ansiedade, agitação, tremores, disartria, confusão, ataxia, fala indistinta, perda dos reflexos, convulsões generalizadas, torpor, depressão respiratória, paralisia respiratória central com respiração de Cheyne-Stokes e coma (ANVISA, 2008). Falk et al. (1996) realizaram um estudo entre agricultores de Venâncio Aires – RS e a cultura de fumo fumigada por agrotóxicos. Em 1995, o índice de suicídios no município duplicou, atingindo 37,22 em cada 100 mil habitantes, sendo 60% na área rural e coincidindo com o aumento do uso de agrotóxicos nas lavouras de fumo, consequência de uma seca e aumento de pragas. A cidade apresentou um índice maior que o do estado do Rio Grande do Sul, assim como em 15 dos 17 anos estudados a maior mortalidade por suicídio, sendo superior a outros países do mundo com dados disponíveis desde 1991.

A ocorrência de autismo também vem sendo associada com o uso de agrotóxico. Shelton et al. (2014) relataram um aumento de risco de 60% para autismo de crianças de mães que moravam próximas a zonas rurais aonde foram aplicados organofosforados. Segundo Souza (2017), como os organofosforados interferem no sistema colinérgico e este é importante para o desenvolvimento do SNC, a interferência pode ocasionar

um mal desenvolvimento em alguma via neural importante, desencadeando as vias patológicas que levam ao autismo.

Quanto aos efeitos na reprodução, sabe-se que agrotóxicos como o dibromocloropropano podem causar esterilização em homens, enquanto clordercona, tirame e zirame produzem efeitos negativos no sistema reprodutivo feminino. Além disso, a teratogenicidade ou toxicidade fetal em mamíferos foi reportada como consequência de pesticidas como carbaril, captan, folpete, difolatan, organomercúrios, 2,4,5-T, pentacloronitrobenzeno, paraquat, maneb, zineb e benomil (OMS, 1990).

Diversos trabalhos citam determinados agrotóxicos, como por exemplo, o herbicida 2,4,5 triclofenoxiacético, como potenciais causadores de aborto (Ramos & Silva Filho, 2004). Paganelli et al. (2010) citam a ocorrência de abortos espontâneos relatados por famílias próximas de áreas baseadas em agricultura de organismos geneticamente modificados com uso de glifosato como herbicida. Arbuckle (2001) relataram que glifosatos, triazina, tiocarbamatos, herbicidas, fungicidas e outros variados pesticidas podem aumentar o risco de aborto espontâneo dependendo do período de exposição: com menos de 12 semanas antes da concepção, a exposição à herbicidas de ácido fenoxiacético em adição com triazinas aumenta o risco de aborto espontâneo. Entre 12 e 19 semanas antes da concepção, o risco de aborto é aumentado mediante a exposição a tiocarbamatos, glifosato, fungicidas e variadas classes de pesticidas. Depois da concepção, variadas classes de pesticidas têm chance elevada de causar abortos em qualquer semana, como o 2,4-D, dicamba, glifosato e herbicidas de ácido fenoxiacético.

Em março de 2011, foram divulgados dados de uma pesquisa com parceria entre a Fiocruz e a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMG), que averiguaram os efeitos do uso de agrotóxicos em Campo Verde e Lucas do Rio Verde, dois dos principais municípios produtores de grãos do estado do Mato Grosso (Londres 2011). Foi observado que 100% das amostras de leite materno coletadas entre a 3ª e 8ª semana pós-parto continham algum tipo de agrotóxico e, em 85% dos casos, entre dois e seis tipos. Nas variáveis estudadas, o aborto se manteve associado à presença de três agrotóxicos, sendo o diclorodifenildicloroetileno (DDE) o de maior incidência (Londres 2011).

Assim, é possível observar que o contato crônico com agrotóxicos pode levar a diversos tipos de perturbação da saúde humana, seja de forma fisiológica, genética, psicológica e sobre a reprodução.

1.3 AGROTÓXICOS: EFEITOS SOBRE O AMBIENTE E BIODIVERSIDADE

Além dos efeitos causados sobre a saúde humana, o uso extensivo de agrotóxicos vem causando grande preocupação em relação aos potenciais danos que eles podem causar no ambiente. Os impactos indiretos dizem respeito à contaminação que atinge a biota, gerando mudanças na composição de espécies, favorecendo estabelecimento de espécies mais resistentes e que podem trazer malefícios ao homem, assim como levando à diminuição da biodiversidade e, conseqüentemente, desequilíbrio ecológico (Moreira et al., 2002).

Os agrotóxicos são utilizados principalmente no solo, onde a preocupação é voltada para inativação e morte de microrganismos e invertebrados responsáveis pela degradação da matéria orgânica e oferta de nutrientes. A degradação destes agrotóxicos pode ocorrer rapidamente ou progressivamente, com tempos variáveis de persistência, de dias a anos (Edwards, 1993; Ribas & Matsumura, 2009). A transferência desses químicos do ambiente terrestre para os aquáticos é constante e ocorre pelas elevadas quantidades de uso destes produtos em áreas agrícolas em conjunto com as altas taxas de erosão do solo. Os agrotóxicos agrícolas atingem os recursos hídricos superficiais ou subterrâneos, importantes para os processos biogeoquímicos. Além disso, espécies não-alvo, ou seja, aquelas que não interferem no processo de produção agrícola, também são contaminadas pelo uso de agrotóxicos (Bortoluzzi et al., 2006; Ribas & Matsumura, 2009). A contaminação indesejada é um efeito indireto de grande importância para o crescimento, fisiologia e reprodução dos organismos, assim como todo o processo ecológico populacional e da comunidade em que eles estão inseridos. No entanto, esses efeitos na biota são difíceis de avaliar e só são considerados quando ocorrem de forma gritante, como o desgaste da casca dos ovos de répteis e aves ameaçados de extinção (Edwards, 1993). Adicionalmente, o descarte indevido de embalagens vazias ameaça o meio por sua difícil decomposição (principalmente quando submerso) e essas acumulam no ambiente por anos, potencializando o crescente desgaste dos ecossistemas e o comprometimento da qualidade de vida do ser humano (Araújo et al., 2000).

Bortoluzzi et al. (2006) relataram a transferência da poluição por agrotóxicos do ambiente terrestre para o aquático, principalmente em áreas agrícolas, sendo esta poluição

de difícil identificação, monitoramento e controle. Os mesmos autores constataram o comprometimento das águas superficiais em uma microbacia hidrográfica de cabeceira com cultivo de fumo em Agudo - RS. Grützmacher et al. (2008) também obtiveram a confirmação de quatro tipos de agrotóxicos presentes em águas de mananciais hídricos de dois pontos no Rio Grande do Sul, onde ocorriam aplicações de agrotóxicos em cultura de arroz (no Canal São Gonçalo e no Rio Piratini).

Em 2009, pesquisadores da Universidade Federal do Ceará buscaram a presença de agrotóxicos em águas da região da Chapada do Apodi, analisando torneiras e caixas d'água públicas e residenciais, nos canais que abastecem a comunidade e em poços profundos. Em todas as amostras foi detectada presença de agrotóxicos. Cinco diferentes agrotóxicos foram encontrados em caixas d'água públicas e, numa mesma amostra de água, foram encontrados 12 diferentes tipos de agrotóxicos. O aquífero Jandaíra, no Ceará e Rio Grande do Norte, também já se encontra contaminado, segundo a Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos, o que gera preocupação pois o mesmo está localizado cem metros abaixo da terra (Londres, 2011).

Mesmo em baixas concentrações no meio aquático, os agrotóxicos afetam a estrutura e função da comunidade, causando perturbações em diversos níveis – molecular, tecidual, de órgãos, indivíduos, populações e comunidades - comprovando o alto impacto de práticas agrícolas extensivas que estão diretamente relacionadas à redução da biodiversidade. Até em regiões distantes e sem agricultura, resíduos de inseticidas organoclorados como o DDT e o DDE são encontrados no tecido adiposo de leões marinhos e outros mamíferos aquáticos (Grisolia, 2005).

A susceptibilidade dos organismos vivos aos agrotóxicos é muito diferente. A começar pela diversidade de microrganismos, que é muito ampla, apresentando imensa heterogeneidade em suas formas, estruturas, fisiologias, fontes de alimento e ciclos de vida, dificultando a avaliação ou previsão dos efeitos dos agrotóxicos sobre eles, agravando-se pela utilização destes químicos como fontes de alimento. Pelo grande número de microrganismos, a toxicidade é estimada com base em testes em alguns grupos de organismos, pois é impossível testá-la individualmente (Edwards, 1993).

Mello (2013) avaliou o impacto do uso de clomazona na riqueza, abundância e composição de macroinvertebrados aquáticos entre as lavouras de arroz irrigadas no Sul do Brasil e áreas úmidas naturais. Como resultado, a autora constatou que a comunidade de

macroinvertebrados aquáticos é influenciada negativamente pela presença de agrotóxicos na água, além de serem muito sensíveis à aplicação desses químicos. Desta forma, esse grupo pode ser utilizado para avaliação de contaminação de ecossistemas aquáticos. Tillmann et al. (2001) expuseram caracóis das espécies *Marisa cornuarietis* e *Nucella lapillus* a concentrações de 0,03, 0,1 (somente *M. cornuarietis*), 0,3 e 1 µg de vinclozolin por litro de água em um aquário durante 5 e 3 meses, respectivamente. Para *M. cornuarietis*, o tamanho do pênis e dos órgãos acessórios masculinos foi reduzido em espécimes sexualmente imaturas e era irreversível em machos que atingiram a puberdade. Para *N. lapillus*, houve redução no tamanho do pênis, da glândula da próstata e do número relativo de machos com esperma maduro estocado na vesícula seminal. Utilizando outro invertebrado como organismo modelo, Lemos et al. (2009) colocaram *Porcellio scaber* (Isopoda) em solo contaminado, também com o vinclozolin, em concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1.000 mg de ingrediente ativo (a.i.) por kg do solo para adultos e 5, 10, 25, 50 e 100 mg a.i./kg para juvenis. Após 4 semanas de experimento, a maior mortalidade ocorreu em 1.000 mg a.i./kg em adultos. Na décima semana, todos os adultos morreram na maior concentração e metade a 300 mg a.i./kg. A muda desses invertebrados, conforme aumentava a concentração do agrotóxico, demorava para ocorrer. Já a concentração de 20-hidroxiecdisona, um hormônio que controla a ecdise, aumentava dependendo do tempo e da concentração, consequentemente, atrasando a muda. Os mesmos autores em 2010 colocaram *Porcellio scaber* em solo contaminado, também com o vinclozolin, em concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1.000 mg a.i./kg e observaram uma diminuição na fertilização de fêmeas em 1.000 mg a.i./kg e aumento da taxa de inviabilidade dos ovos conforme a concentração aumentava, atingindo 100% na maior dose (Lemos et al., 2010).

Em vertebrados, muitos trabalhos relatam efeitos teratogênicos causados por diferentes agrotóxicos. Alguns deles, como os organofosforados, podem causar efeitos no fígado, músculo e cérebro, que são órgãos envolvidos na glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese e glicólise, assim como no pâncreas, responsável pelo controle hormonal da homeostase da glicose pela secreção de glucagon e insulina (Rahimi & Abdollahi, 2007).

A exposição de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) ao glifosato resultou em uma diminuição do índice gonadosomático nas fêmeas tratadas (índice que expressa a porcentagem que as gônadas representam no peso total do corpo dos indivíduos), menor número de ovos por fêmea, aumento da mortalidade dos embriões, atraso no desenvolvimento e incubação conforme aumento da concentração de glifosato, além de anormalidades no ovário, aumentando com o acréscimo da concentração de glifosato, ocasionando a presença de tecido

anormal (Webster et al., 2014). Kiparissis et al. (2003) expuseram medakas japonesas (*Oryzias latipes*) ao fungicida vinclozolin por períodos de um dia após a eclosão até 100 dias após o nascimento, observando uma diminuição na densidade de espermatozoides e fibrose testicular. Em concentrações altas do fungicida, os peixes machos e fêmeas apresentavam tamanho e peso maior. Em fêmeas tratadas com altas doses, havia números elevados de oócitos atrésicos. No mesmo trabalho, os peixes foram expostos ao vinclozolin puro, o que resultou na inibição da espermatogênese, diminuição do tamanho e peso de machos, e fêmeas apresentando ovários com oócitos em estágios iniciais de desenvolvimento e de tamanho reduzido. Peixes da espécie *Channa punctatus* foram expostos a carbamato sevin por 15, 30 e 60 dias, apresentando hiperglicemia depois dos dias 30 e 60, tendo uma diminuição gradual no glicogênio muscular nos três períodos, diminuição significativa de atividade da piruvato desidrogenase nos três períodos no fígado, rim, cérebro e músculos, após 30 ou 60 dias nas brânquias e depois de 60 dias no intestino. Na atividade da succinato desidrogenase, mudanças significativas foram encontradas depois de 15 dias com diminuição no músculo; após 30 ou 60 dias houve redução de sua atividade no fígado, cérebro e músculos (Sastry & Siddiqui, 1982). Segundo Koundinya & Ramamurthi (1979), a exposição de sumithion à espécie *Sarotherodon mossambicus* por 48 horas ocasionou um aumento da glicose no sangue devido a um aumento na atividade fosforilase do fígado. Os autores comentam a possibilidade de a hiperglicemia ser mediada pelo glucagon, que age principalmente no tecido hepático.

No fígado de fêmeas de *P. promelas*, o linuron afetou proteínas relacionadas ao fator de crescimento epidérmico - um regulador do ciclo celular e controlador da proliferação e sobrevivência celular -, e sinalização MAPK14 – envolvido em respostas celulares a estímulos pró-inflamatórios e de estresse sendo que a rede molecular que incluiu essas proteínas foi significativamente aumentada após a exposição à linuron. Ainda, a prostaglandina E sintase 3, uma proteína relacionada com o reparo hepático após danos, foi aumentada no fígado assim como *DDRGK domain-containing protein 1*, que auxiliam a prevenir apoptose em tecidos excretores sob estresse, e a peroxirredoxina, que detoxicam peróxidos. Houve uma diminuição significativa de proteínas ribossômicas em relação ao controle, assim como diminuição da fosfoetanolamina metiltransferase, participante do metabolismo de glicerofosfolipídeos (Martyniuk et al., 2012). Em outro estudo transcriptômico embriões de *Salmo trutta* foram expostos a três concentrações de linuron: 2,5, 25 e 250 µg/L durante quatro dias. Foi observada uma diminuição significativa do colesterol do fígado, associado a uma redução na expressão de transcritos relacionados à biossíntese de colesterol; também houve evidências de uma resposta

ao estresse oxidativo, uma vez que os antioxidantes relacionados com glutathione foram aumentados no nível de mRNA (Webster et al., 2015).

Lajmanovich et al. (2003) estudaram girinos da espécie *Scinax nasicus* expondo-os a diferentes concentrações de glifosato. Segundo o trabalho, em tempos prolongados de exposição, há aumento na toxicidade desse químico. Foram observadas larvas com deformações craniais e da boca, olhos anormais e cauda curvada e dobrada, sendo esses efeitos ampliados com o tempo e concentração do agrotóxico. Entretanto, muitos autores indicam a existência de variação da tolerância de pesticidas entre e dentro das espécies de anfíbios (Bridges & Semlitsch, 2000). O atrazina, após 48 horas de contato com *Xenopus laevis* a 18 µg/L ocasionou diminuição no volume testicular (Tavera-Mendoza et al, 2002) e, em outro estudo utilizando atrazina, redução no tamanho da laringe (ocasionando desmasculinização) (Parshley, 2000). Já Hayes et al. (2006), ao submeterem os embriões de *X. laevis* a 0,1, 0,4, 0,8, 1 e 25 ppb, observaram casos de embriões hermafroditas e machos com testículos múltiplos (despedaçados, lobados ou descontínuos). Utilizando injeção de glifosato em embriões da espécie *X. laevis*, Paganelli et al. (2010) observaram uma redução na expressão do marcador *Slug* da crista neural, que é necessário para a perda da adesão celular e transição epitélion-mesênquima dessas células, além de perda de rombômeros, diminuição dos neurônios primários, defeitos na cartilagem em fases posteriores do desenvolvimento, diminuição da expressão do sinalizador *Shh*, redução das estruturas craniais e microftalmia, assim como problemas oculares (desaparecimento ou ciclopia). Jayawardena et al. (2010) estudaram o efeito da exposição de clorpirifós, glifosato e propanil, dissolvidos em água, na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de malformações em sapos da espécie *Polypedates cruciger*. Foi observado aumento na mortalidade, tamanho corporal reduzido, malformações na coluna vertebral (cifose e escoliose), úlceras e edemas na pele (Jayawardena et al., 2010). Em embriões e girinos das espécies *Pseudacris regilla*, *Rana catesbeiana*, *R. aurora* e *X. laevis*, que vivem em regiões ribeirinhas, os efeitos do diuron foram testados através de bioensaios de toxicidade agudos e subcrônicos (2 semanas). A mortalidade mais alta foi em embriões de *P. regilla*, com 13,3% a uma concentração de 29,1 mg/L e 80% apresentaram malformações como, por exemplo, edemas. Quanto à mortalidade dos girinos, houve variação de acordo com a idade dos girinos quando começou o teste e dias de exposição. Aproximadamente 62,5% (idade de 12 dias e 14 dias de exposição) e 87,5% (idade de 24 dias e 14 dias de exposição) de mortalidade ocorria em *P. regilla* a 29,1 mg/L. Em *R. catesbeiana* foi observada mortalidade de 91,7% (15 meses de idade e 21 dias de exposição) e 8,3% (29 dias de idade e 14 dias de exposição) a 29,1

mg/L. A mortalidade foi de 80% (7 dias de idade e 14 dias de exposição) em girinos de *R. aurora* expostos a uma concentração de 29,1 mg/L. Em girinos de *X. laevis* na mesma idade de 11 dias e 14 dias de exposição ocorreu mortalidade de 73,3 e 93,3% a 29,1 mg/L (Schuytema & Nebeker, 1998). Greulich et al. (2002) testaram a absorção de isoproturon em estágios iniciais de desenvolvimento de *Bombina bombina* e *B. variegata*. Marcando o herbicida com anel-¹⁴C, um isótopo radioativo, eles observaram que o composto consegue passar pela camada gelatinosa do ovo, expondo o embrião ao herbicida. A exposição a aproximadamente 1 µg/L (que é ambientalmente relevante em níveis detectados em lagos agrícolas) resultou em paralisia com alta mortalidade de metade dos girinos de *B. variegata*. Ainda, em concentrações entre 0,1 a 100 µg/L, houve diminuição na capacidade dos girinos em afundarem como uma resposta de evasão quando estimulados. Os girinos também apresentaram indução da enzima glutathione S transferase, envolvida na desintoxicação celular, após exposição ao herbicida puro e às misturas. Já Orton et al. (2009) incubaram oócitos de *X. laevis in vitro* com diuron e linuron durante 20 horas, resultando numa elevada taxa de progesterona e diminuição da produção de testosterona, assim como diminuição da ovulação. Segundo o mesmo autor, a ovulação também foi prejudicada por isoproturon, mas sem afetar os níveis de esteroides. Para os três agrotóxicos em determinadas concentrações, foi encontrada evidência de ação anti-androgenicidade (para diuron 15,6-31,3 µM ou 3.5-7.2 mg/L; linuron 0,98-62,5 µM ou 0,25-15,6 mg/L; e isoproturon 125-250 µM ou 25,7-51,5 mg/L) (Orton et al., 2009).

Diversos trabalhos, como de Hunt & Keith (1962), Moore & Walker (1964), Cramp & Conder (1965), Moore & Tatton (1965), Keith (1966) e Robinson et al. (1967) encontraram resíduos de organoclorados (DDE e dieldrin) em ovos de diferentes aves. Apesar da utilização de organoclorados ter diminuído, a presença de outros agrotóxicos de efeitos agudos tem sido relatada com mais frequência e, ao invés de interferir na reprodução ou acumular em tecido adiposo, causam uma maior mortalidade das aves (Edwards, 1993; Menq, 2011). Atualmente a mortalidade das aves ocasionada pelo uso de agrotóxicos vem sendo monitorada em diversos países. Muitos dos dados resultantes desses monitoramentos, assim como os de informações experimentais sobre toxicidade aguda e crônica, podem servir para que alguns agrotóxicos não sejam mais utilizados dentro do país.

O agrotóxico paration, aplicado por meio de injeção nos ovos em embriões das aves *Coturnix coturnix japonica* e *Anas platyrhynchos*, interferiu no crescimento do esqueleto axial dos embriões (Dunachie & Fletcher, 1969). Meiniel (1977, 1978) reportou uma relação entre a inibição da colinesterase embrionária e o aparecimento de anomalias no

esqueleto axial resultantes da exposição ao paration. Hoffman & Eastin (1981) testaram aplicação externa de paration e diazinon em emulsão aquosa nos dias 3 e 8 do desenvolvimento em ovos férteis do pato-real *A. platyrhynchos*, observando que os animais tratados com paration tiveram peso significativamente menor que o grupo controle, quando a dose era igual ou maior à LD₅₀ (dose letal mediana), além de ocasionar efeitos teratogênicos, como severo encurtamento e contorção do esqueleto axial. O diazinon também produziu efeitos teratogênicos mediante dose igual ou maior que a LD₅₀, e, além disso, causou edemas, nanismo e baixa incidência de vértebra cervical fusionada. Quando a aplicação foi feita por veículo de óleo diretamente no interior do ovo, o paration apresentou teratogenicidade muito alta, resultando em deformações visíveis, com pescoço contorcido ou encurtado, escoliose ou lordose do esqueleto axial, edemas subcutâneos, bolhas cheias de líquido e crescimento reduzido. Além disso, foi observada significativa inibição da colinesterase plasmática com diazinon em ambos os veículos e paration com o veículo de óleo, com grande depressão da atividade cerebral (Hoffman & Eastin, 1981). Em *Gallus domesticus*, utilizando doses de 10, 25, 35 e 50 µg de fosfamidona, Sahu & Ghatak (2002) observaram diminuição significativa dos pesos totais dos embriões, assim como os pesos do cérebro, medula espinhal, fígado e rim. Também encontraram malformações como atraso no desenvolvimento do coração, desenvolvimento anormal do cérebro, microftalmia, focomelia, órgãos internos anormalmente expostos e bicos cruzados ou ausente. Administrando doses de 10, 15, 25 e 40 µg de imidacloprida por método de injeção na câmara de ar do ovo, Hussein et al. (2014) encontraram malformações morfológicas nos embriões de aves, como crescimento retardado, aumento da cabeça, membros torcidos, encurtamento do bico, ectopia visceral e falha na retração do saco da gema. Com doses de 0,06, 0,12, 0,23, 0,46, 0,91, 1,82 e 3,63 de atrazina em 50 µL injetadas na câmara de ar do ovo, Joshi et al. (2013) observaram em embriões de galinha defeitos cardíacos, ausência parcial ou total da parte caudal e suas estruturas, gastroquise, microftalmia ou anaftalmia, hipoplasia craniofacial e falhas no fechamento do tubo neural. Foi demonstrado em aves que o contato com agrotóxicos pode afetar o metabolismo dos organismos, causando alterações na via glicolítica (Deotare & Chakrabarti, 1981; Reena et al., 1989; Rezg et al., 2006). Arsenault et al. (1975) utilizaram exposição a malation por injeção em ovos de galinha, coletando sangue para determinar o nível de glicose, observando uma diminuição no nível de açúcar no sangue. No entanto, no estágio de eclosão, essas aves apresentaram um aumento no nível de açúcar no sangue, alguns chegando a um quadro de hiperglicemia.

Através da administração oral de diazinon diluído em óleo de milho a hamsters, foi observado que sinais colinérgicos como diarreia, salivação e descoordenação eram características dos animais tratados (Robens, 1969). Em coelhos, com a mesma administração, altas doses dessa substância produziram severos sinais colinérgicos e morte de alguns dos animais. Gray et al. (1994) administraram vinclozolin em ratas prenhas e posteriormente mensuraram os filhotes, observando uma redução do crescimento de ratos machos após a puberdade, redução da distância anogenital (em comparação com o crescimento neonatal e infantil), hipospadia e consequente inabilidade de inseminar fêmeas, além de malformações como presença de mamilos em machos, testículo ectópico em uma posição suprainguinal, fenda palatina, granulomas epididimais (aumentando o peso e variabilidade do epidídimo), redução do peso da vesícula seminal e da próstata ventral e redução do epidídimo e do número de espermatozoides. Em fêmeas, a distância anogenital também foi reduzida significativamente (Gray et al., 1994). Ao testar constituintes do sangue sob efeito de agrotóxicos em ratos, Reena et al. (1989) utilizaram dimetoato por 15 e 30 dias, obtendo um aumento na concentração de glicose no sangue. Deotare & Chakrabarti (1981) encontraram um aumento na atividade da glicose-6-fosfatase e fosforilase do fígado em ratos albinos tratados com injeção subcutânea de acefato, aumentando ligeiramente a concentração de açúcar no sangue devido à quebra de glicogênio no fígado. A administração subcrônica oral de malation em ratos, por 32 dias, também aumentou a atividade da hexoquinase, enzima envolvida no processo de glicogênese (Rezg et al., 2006). Krüger et al. (2014) relataram a aparição de leitões malformados e as causas, possivelmente relacionadas ao uso de agrotóxicos. Os leitões apresentaram anormalidades como atrofia da orelha, deformidades da coluna vertebral e crânio, atrofia da perna, malformação ocular, ausência do tronco, língua anormalmente grande, leitoas com testículos, inchaço na barriga, intestinos não conectados, além de órgãos malformados. Essas anormalidades estavam relacionadas com a alimentação da matriz nos primeiros 40 dias de gestação, sendo que a taxa de anormalidade aumentava com a quantidade aumentada de glifosato na ração.

A toxicidade do vinclozolin foi testada em culturas in vitro de linfócitos bovinos, produzindo um aumento de aberrações cromossômicas, redução do índice mitótico, aumento da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e aumento nas trocas entre cromátides-irmãs, sugerindo que os agrotóxicos testados induziram estresse oxidativo ou tiveram efeito mutagênico (Lioi et al., 1998).

Anomalias na fisiologia e morfologia relacionadas ao contato com agrotóxicos foram reportadas até mesmo em plantas, como a *Zostera capricorni*, que, quando exposta aos herbicidas atrazina, diuron e irgarol, teve sua atividade fotossintética e concentrações de pigmentos fotossintéticos impactados (Macinnis-NG & Ralph, 2003).

Assim, pode-se observar que os agrotóxicos possuem efeito não só sobre os seres humanos, mas sobre todas as formas de vida dos ambientes expostos a esses químicos.

1.4 O IPRODIONA E SEUS EFEITOS SOBRE ORGANISMOS VIVOS

O iprodiona (3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxoimidazolidina-1-carboxamida, de fórmula $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$) é um fungicida de contato amplamente utilizado na lavoura de café, alface, batata, feijão, tomate, entre outros. Pertence ao grupo dicarboximida, que inclui, além do iprodiona, o vinclozolin e procimidona, e é utilizado na agricultura por possuir propriedade erradicante e protetora contra esporos e micélios de variados fungos (FAO, 2006), devido ao efeito inibitório da biossíntese de triglicerídeos. A 133°C apresenta-se em forma sólida, sendo lentamente hidrolisado em pH 5 e progressivamente mais rápido em altos valores de pH. É degradado somente por fotólise, de forma lenta. Sua solubilidade em água não é dependente do pH e não possui propriedades ácidas ou básicas. Os principais tipos de formulação são pós molháveis, grânulos dispersáveis em água e suspensão concentrada, registradas e vendidas em cerca de 90 países por todos os continentes. Pode ainda ser formulado em conjunto com outros fungicidas, como carbendazim, metil tiofanato, difenoconazole ou bromuconazole (FAO, 2006).

O Rovral®, um fungicida a base de iprodiona, possui classificação toxicológica do tipo II, ou seja, é altamente tóxico, e classificação ambiental do tipo III, sendo considerado um produto perigoso ao meio ambiente (FMC Agrícola, 2014). Segundo revisão realizada pela *European Commission* em 2002, o iprodiona poderia ser responsável por diversos efeitos negativos à saúde a curto e longo prazo, como atrofia, hiperplasia e alteração de peso no fígado, nos ovários, nos rins e vesículas seminais em ratos.

Já foi demonstrado que o iprodiona consegue se difundir em água, contaminando organismos aquáticos (Wauchope et al., 1992). Estudos indicaram que gônadas imaturas do peixe *Oncorhynchus mykiss* tratadas com iprodiona, apresentaram aumento significativo do marcador para estresse oxidativo malondialdeído, além de redução do

antioxidante glutatona e decréscimo da atividade da peroxidase catalase (Radice et al., 2001), demonstrando que organismos vertebrados também sofrem danos oxidativos quando expostos ao iprodiona.

Os mecanismos de toxicidade deste fungicida em humanos não são conhecidos. No entanto, estudos subcrônicos em ratos, através de dieta, mostram sintomas como postura encurvada, piloereção, extremidades pálidas e frias, emagrecimento, além de diminuição no peso do útero. Em doses mais elevadas, as glândulas adrenais e pituitária de ambos os sexos foram afetadas pelo iprodiona (FMC Agrícola, 2014). Ratos (*Sprague-dawley*) imaturos foram submetidos por gavagem a diferentes concentrações de iprodiona diariamente (0,50, 100 e 200 mg/kg) e foi observado um atraso significativo do início e término da puberdade (marcada pela separação prepucial do pênis destes ratos) a 100 e 200 mg/kg/dia, assim como aumento significativo do peso corporal na separação prepucial (Blystone et al., 2007). As necropsias no dia pós-natal 51/52 utilizadas para examinar os efeitos na esteroidogênese e nos pesos dos órgãos mostraram que o peso corporal não foi afetado em nenhum dos tratamentos e não houve toxicidade sistêmica manifestada. O iprodiona aumentou significativamente os pesos adrenais e hepáticos e diminuiu os pesos de vesículas seminais e epidídimos a 200 mg/kg/dia. Os pesos da próstata ventral, glândula de Cowper e glândula de Cowper não foram afetados pelo tratamento. A testosterona diminuiu significativamente em doses de 50 (73%), 100 (83%) e 200 mg/kg/dia (89%) (Blystone et al., 2007).

Em cães, também por administração na dieta, foi observado aumento de peso do fígado e rins, diminuição do peso corporal, prostração, danos nas hemoglobinas e diminuição leve do peso uterino (FMC Agrícola, 2014).

1.5 EMBRIOTOXICIDADE DO IPRODIONA EM EMBRIÕES DE AVES

A pulverização do fungicida Rovral® na agricultura pode atingir ovos fertilizados em ninhos de aves que nidificam diretamente no solo, como é o caso do bacurau-chintã (*Hydropsalis parvula*), perdiz (*Rhynchotus rufescens*), quero-quero (*Vanellus chilensis*), tico-tico-de-bico-amarelo (*Arremon flavirostris*) e codorna-amarela (*Nothura maculosa*). Ainda é possível que a pulverização do fungicida atinja ovos de aves que nidificam em ninhos feitos sobre a água, geralmente próximos às margens de rios e lagos com correnteza calma, como é o caso do mergulhão-pequeno (*Tachybaptus dominicus*).

Além da pulverização dos ninhos, pesquisas indicam que o declínio de populações de aves pode estar relacionado ao consumo de insetos e outros pequenos animais presentes em plantações e contaminados por agrotóxicos (Menq, 2011), o que pode afetar a sua reprodução. As aves são organismos considerados mais sensíveis à exposição de químicos, pois possuem baixos níveis de enzimas detoxificantes e hábitos alimentares específicos (Grue & Shipley, 1984; Parker & Goldstein, 2000; Valdes, 2007). Essa contaminação dos animais adultos pode resultar na transmissão de componentes químicos aos ovos, prejudicando o processo de desenvolvimento embrionário normal.

Os embriões de aves são caracterizados por suas várias semelhanças aos embriões de mamíferos, pois são também animais amniotos, sendo um modelo amplamente utilizado no estudo da embriologia. Segundo o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), o *International Chicken Genome Sequencing Consortium*, em 2004, analisou o sequenciamento genético da galinha-de-selva-vermelha (*Gallus gallus*), progenitor de galinhas domésticas. Segundo o diretor do NHGRI, Francis S. Collins, esse genoma preenche uma lacuna importante para o conhecimento científico, inserido entre os mamíferos e peixes na árvore da vida, fornecendo novas perspectivas sobre a evolução do genoma e biologia humana e possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a saúde humana. Segundo o *International Chicken Genome Sequencing Consortium*, o genoma da galinha contém uma quantidade significativamente menor de DNA do que o genoma humano, porém o mesmo número de genes, aproximadamente. Cerca de 60% dos genes de galinha corresponde a um gene humano análogo e 75% dos pares de bases correspondentes entre os genes de galinha e humano são idênticos. Por exemplo, genes de galinha que codificam para proteínas específicas da casca do ovo têm semelhantes em mamíferos, que desempenham papel na calcificação óssea. Além disso, galinhas possuem o gene codificante para a interleucina-26, envolvida na resposta imune, conhecida anteriormente apenas em humanos. Logo, a galinha representa um ótimo modelo de estudo da embriologia de organismos amniotos. Adicionalmente, os ovos férteis de galinha são de fácil aquisição a partir da compra de produtores da região, e de fácil manipulação e armazenamento, sem necessidade de um biotério, representando um excelente modelo de estudo.

Em laboratório, o tratamento por injeção na câmara de ar do ovo pode auxiliar na avaliação da toxicidade aguda em aves, sendo que para determinados compostos este método se aproximaria da embriotoxicidade ocorrida em ambiente natural (McKernan et al., 2007; Menq, 2011). A galinha é uma espécie de estudo muito utilizada para avaliar a embriotoxicidade

de produtos químicos e vem ganhando espaço graças ao baixo custo e semelhança no desenvolvimento em relação aos mamíferos (Korhonen et al., 1982). Estudos envolvendo embrião de galinha com o iprodiona são difíceis de serem encontrados. Outros agrotóxicos de grupos como dos organoclorados ou organofosforados são encontrados mais comumente.

Considerando o pouco conhecimento acerca dos efeitos que o iprodiona exerce sobre o desenvolvimento de organismos amniotos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar consequências morfológicas da aplicação de Rovral® (iprodiona) sobre o desenvolvimento embrionário, utilizando como modelo embriões de galinha.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL: analisar o efeito do iprodiona sobre o desenvolvimento de embriões de galinha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Encontrar a dose letal média (LD_{50}) do iprodiona para embriões de galinha;
- Analisar os efeitos do iprodiona em sua LD_{50} sobre o peso total dos embriões de galinha;
- Analisar se o tratamento com iprodiona em sua LD_{50} gera atrasos ao desenvolvimento dos embriões de galinha;
- Analisar os efeitos do iprodiona em sua LD_{50} sobre a morfologia geral externa de embriões de galinha;
- Analisar os efeitos do iprodiona em sua LD_{50} sobre a morfometria de embriões de galinha.

3 METODOLOGIA

Por se tratar de uma pesquisa com experimentação animal, o presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz de Cascavel, com número de registro 1607, protocolado em 15/04/2016 (Anexo A).

3.1 TRATAMENTO DOS OVOS NO DIA 0

Os ovos fertilizados de galinha foram obtidos através de compra de produtores rurais da região. Assim que chegaram ao laboratório, os ovos foram examinados para a presença de defeitos, seguido de descarte caso apresentassem danos. Posteriormente foi realizada a limpeza dos ovos com álcool 70% e, em seguida, eles foram pesados, numerados e submetidos ao contato com iprodiona. Diferentes concentrações de iprodiona foram diluídas em água e injetadas (1 $\mu\text{L/g}$ de ovo) diretamente na câmara de ar dos ovos, através de um buraco feito por uma tesoura e fechado em seguida com cola quente (Figura 1A e 1B, respectivamente). Todo o procedimento com o iprodiona foi realizado dentro de uma capela Sppencer para exaustão de gases.

Diversos testes piloto foram realizados, visando encontrar a LD_{50} , concentração que foi utilizada para as análises de morfologia e morfometria. Inicialmente foi utilizada a concentração recomendada para uso de 150 mL/100 L de água, ou seja, 1,5 $\mu\text{L/mL}$ do produto comercial e, a partir dos resultados encontrados, a concentração foi sendo progressivamente ajustada até atingirmos a LD_{50} . Paralelamente, ovos controles foram injetados com água, e outros foram incubados sem nenhuma injeção, para verificação da viabilidade dos embriões. Como os ovos ou seu fornecimento apresentaram problemas, todos os testes tiveram ao menos dois ovos controles para verificar a fertilidade do lote.

Foram usados 134 embriões controles e 237 embriões tratados para encontrar a LD_{50} ; 24 ovos somente incubados sem tratamento também foram utilizados para demonstrar a viabilidade dos embriões. As concentrações utilizadas foram de 1,5 $\mu\text{L/mL}$, 3 $\mu\text{L/mL}$, 6 $\mu\text{L/mL}$, 12 $\mu\text{L/mL}$, 24 $\mu\text{L/mL}$, 48 $\mu\text{L/mL}$, 83,3 $\mu\text{L/mL}$, 93,3 $\mu\text{L/mL}$, 96 $\mu\text{L/mL}$, 100 $\mu\text{L/mL}$, 120 $\mu\text{L/mL}$ e 192 $\mu\text{L/mL}$, conforme demonstrado nas tabelas 1 a 14 do Anexo A. No trabalho utilizamos a concentração letal (LC_{50}) que equivale, para cada ovo, um valor de LD_{50} . Para o LC_{50} de 1,5 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 0,07 a 0,09 μL ; para LC_{50} de 3 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 0,15 a 0,18 μL ; para o LC_{50} de 6 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 0,30 e 0,42

μL ; para o LC_{50} de 48 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 2,29 a 3,26 μL ; para o LC_{50} de 96 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 4,12 a 6,08 μL ; para o LC_{50} de 192 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 10,47 a 11,04 μL ; para o LC_{50} de 120 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 6,44 a 8,14 μL ; para o LC_{50} de 100 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 4,03 a 7,77 μL ; para o LC_{50} de 93,3 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 3,81 a 6,94 μL ; para o LC_{50} de 83,3 $\mu\text{L/mL}$ utilizamos um LD_{50} entre 3,31 a 5,47 μL .

Após a inoculação, os ovos foram mantidos em incubadora automática da marca Chocadeiras Pantanal com temperatura de 38,5°C e umidade constante pelo período de sete dias. Durante as primeiras 24 horas, a rolagem da incubadora foi desligada e os ovos foram mantidos em posição vertical, com a câmara de ar voltada para cima, para que o agrotóxico descesse e fosse absorvido pela gema. Após este período, os ovos foram colocados na horizontal e a rolagem ligada.

3.2 COLETA E FIXAÇÃO DOS EMBRIÕES

3.2.1 Paraformaldeído (PFA) 4%

O PFA é um fixador utilizado para preservar o embrião da decomposição. Um volume final de 500 mL de PFA 4% foi preparado aquecendo-se 300 mL de água destilada em um Becker até aproximadamente 70°C, atentando-se para não atingir temperatura superior a esta. Posteriormente, dentro da capela, foram acrescentados 50 mL do PBS 10x (protocolo abaixo) e 20 g de PFA (Sigma). A barra magnética foi colocada dentro do Becker e este foi deixado em cima de um agitador, misturando a solução por 10 minutos até atingir cor cristalina, sempre coberto para evitar inalação. A solução foi deixada para esfriar em temperatura ambiente.

Para ajuste do pH foi utilizado um pHmetro calibrado em pH 7 e pH 4. No caso deste experimento, o pH estava maior que 7,4, então utilizou-se HCl 0,1M para diminuir o pH. O restante da água foi acrescentado até atingir 500 mL em uma proveta volumétrica. A solução foi aliquoteada em tubos Falcon de 15 e 50 mL, que foram etiquetados e armazenados em freezer (-20°C).

3.2.2 Tampão fosfato-salino (PBS) 10x (10 vezes concentrado)

O PBS é uma solução tampão utilizada para misturar a outros meios e manter praticamente constante o valor de pH, assim como para limpar organismos sem danificar suas células. Para o preparo do PBS 10x, 800 mL de água destilada foram colocados em um Becker, onde foi mergulhado um peixinho e colocado sobre um agitador. Foram pesados 14,4 g de Na_2HPO_4 , 80 g de NaCl, 2,4 g de KH_2PO_4 e 2 g de KCl numa balança analítica Marte/Shimadzu modelo AY-220 e, individualmente, foram misturados na água. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 L. A solução foi depositada em uma garrafa de vidro, etiquetada, autoclavada e guardada na geladeira (4°C).

Para diluir essa solução para PBS 1x, 100 mL de PBS 10x foram colocados em uma proveta de 1000 mL, completando o volume para 1 L com água destilada. A solução foi depositada em uma garrafa de vidro, etiquetada e armazenada na geladeira.

3.2.3 Carnoy

O Carnoy, assim como o PFA 4% também é um fixador. Para seu preparo, utilizamos uma proporção de 6:3:1 de álcool absoluto, clorofórmio e ácido acético glacial, respectivamente. Todos os componentes foram misturados e depositados em uma garrafa de vidro, etiquetada e armazenada na geladeira.

3.2.4 Procedimento e fixação

No sétimo dia de incubação, os ovos foram tirados da incubadora, marcando-se com lápis a parte virada para cima, pois o embrião estaria naquela região, facilitando a coleta. Dentro do fluxo, cada ovo foi quebrado em uma placa de Petri, sendo verificado se o ovo estava galado (fertilizado) ou não, e a presença do embrião vivo ou morto (Figura 1C e 1D, respectivamente). Com auxílio de colher, pinças histológicas e tesoura fina, o embrião foi separado dos demais constituintes, e colocado em outra placa de Petri com PBS 1x, onde foram retiradas todas as membranas extraembrionárias. Foram observadas quaisquer malformações do embrião a olho nu e com auxílio de um microscópio estereoscópico da marca Nikon, tendo como base embriões controles vivos coletados (Figura 1E). O embrião coletado foi então realocado para outra placa de Petri menor, onde foi pesado em uma balança analítica

Marte/Shimadzu modelo AY-220 e, em seguida, colocado em um tubo Falcon contendo PFA 4% ou, em um dos testes, Carnoy. Os tubos Falcon foram separados e etiquetados de acordo com o tipo de tratamento (normais, controles, tratados), dia de coleta e com a situação do embrião (vivo ou morto). Os tubos foram armazenados em geladeira para posterior análise morfológica e morfométrica dos embriões em lupa. As cascas dos ovos foram jogadas no lixo comum, enquanto o constituinte do ovo (gema e clara) foi colocado em um galão para destinação apropriada.

3.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

Em uma placa de Petri pequena, uma cama de parafina preta com 3 a 4 saliências de tamanhos diferentes foi confeccionada (Figura 1F). Cada embrião foi retirado do tubo Falcon com PFA 4% ou Carnoy, passado a uma placa de Petri com PBS 1x para limpeza. O embrião foi então realocado na placa de Petri contendo parafina preta, completamente submerso em PBS 1x. Para as análises de morfologia e morfometria utilizou-se a lupa Zeiss SteREO de série Discovery.V12, com escala de imagem de 8x. Imagens do embrião foram capturadas com o programa AxioVision SE64 e analisadas para as seguintes medidas (Figura 1G): membro superior (do ombro até dígitos), membro inferior (da coxa até dígitos), tronco (do ombro até a curva da cauda), cabeça (do encéfalo até o bico) e diâmetro dos olhos (globo ocular visível), tanto do lado esquerdo como do lado direito. Também, os estágios dos embriões foram estabelecidos conforme estipulado por Hamburger & Hamilton (1951).

3.4 ANÁLISE DE DADOS

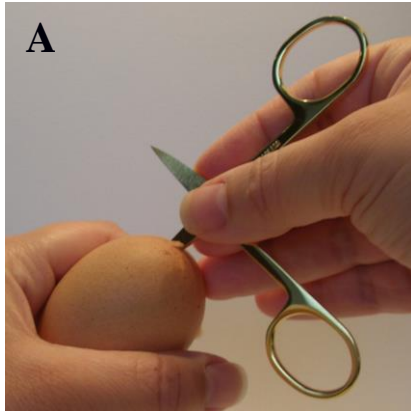
Para análise da mortalidade foram utilizados os números brutos e a porcentagem de mortalidade, exibidos na Tabela 1, considerando apenas os ovos com embriões vivos e mortos, pois os ovos que não possuíam nenhum vestígio do embrião não fazem parte de nenhuma classificação dentro desta análise e, portanto, não foram considerados. Realizamos a construção de um modelo linear entre as porcentagens de mortalidade e as respectivas concentrações testadas. Substituímos na equação resultante o valor de 50% para estimar a LD₅₀.

Para verificar se existem diferenças entre os pesos dos embriões dentre todos os tratamentos (83,3, 93,3 e 100 µL/mL e controles), realizamos o teste de Kruskal-Wallis após verificação de normalidade por Shapiro-Wilk.

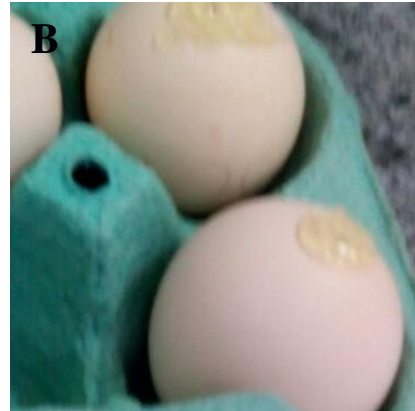
Com o intuito de verificar se os tratamentos com iprodiona a 83,3, 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$ e respectivos controles resultavam em assimetrias morfométricas bilaterais dos membros superiores, inferiores e olhos, realizamos a subtração dos valores morfométricos entre o lado esquerdo e direito para cada morfometria de cada embrião. Consideramos este valor resultante em módulo como sendo o valor de assimetria.

Para verificar diferenças significativas entre cada tratamento (83,3, 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$) e seu respectivo controle, realizamos teste t de Student ou Mann-Whitney, segundo teste de normalidade de dados e transformação logarítmica. As variáveis avaliadas foram as medidas morfométricas, assimetria bilateral e estágios dos embriões vivos. Com o intuito de verificar diferenças significativas entre o lado esquerdo e direito dos membros superiores, inferiores e olhos, realizamos teste t de Student ou Mann-Whitney, segundo teste de normalidade de dados e transformação logarítmica.

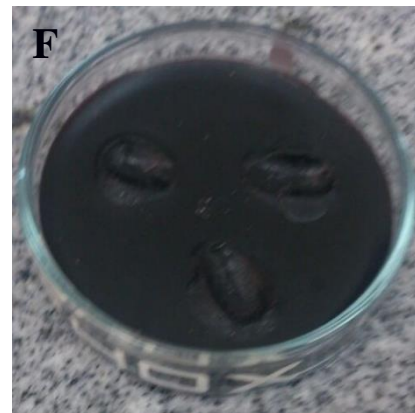
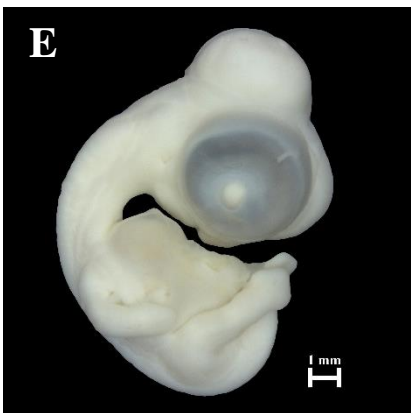
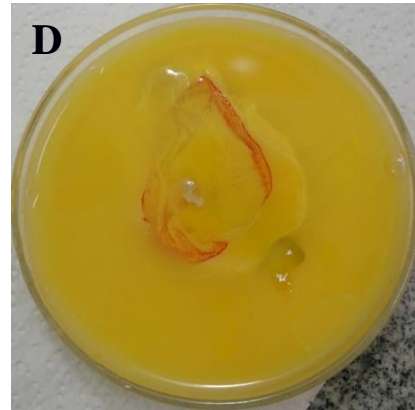
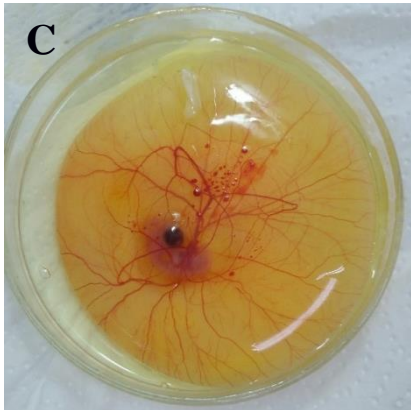
Para verificar se existem diferenças entre os tratamentos 83,3, 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$, realizamos uma MANOVA com teste à posteriori de Hotelling's considerando as variáveis de assimetria morfométrica (membro superior, membro inferior e olhos), e morfométricas da cabeça e do tronco.



Fonte: Shelley Marshall-Nichols, 2012.



Fonte: Scarlatt Santos Moura, 2017.



Fonte: Ricardo Lequito Monsore Jr., 2017.

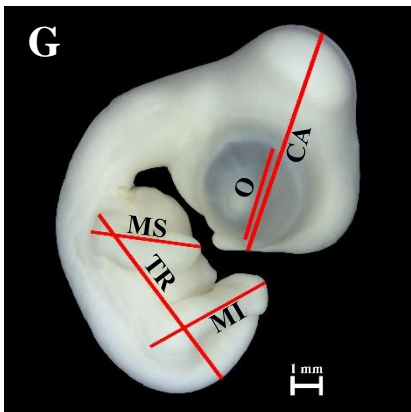


Figura 1 – Procedimentos experimentais. A - furo realizado com auxílio de uma tesoura; B - ovos selados com cola quente; C - ovo com embrião vivo quebrado em placa de Petri; D - ovo com embrião morto quebrado em placa de Petri; E - embrião modelo saudável; F - placas de Petri com parafina preta; G – medidas morfométricas dos embriões: CA – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; TR – tronco.

4 RESULTADOS

4.1 ESTIMANDO A LD₅₀

Durante a estimativa da LD₅₀, houve diversas dificuldades que acarretaram na demora em encontrar a dose letal média. Tivemos dificuldade em encontrar um fornecedor que tivesse produção constante (toda semana) de ovos viáveis (com alta taxa de fertilidade). Também ocorreram problemas quanto à disponibilidade dos ovos de acordo com a época do ano (por exemplo, durante a Quaresma as galinhas diminuíram a produção de ovos). Testamos a viabilidade dos ovos (através de incubação por alguns dias, sem qualquer manipulação) de seis diferentes produtores (feira do PTI, feira da JK, feira da Vila A, Colégio Agrícola, Vila Portes, Lar Cooperativa Agrícola) até encontrar o local ideal para o fornecimento (produtor da região de São Miguel do Iguaçu – PR).

Para estimar a LD₅₀, realizamos diversos testes em diferentes concentrações crescentes do iprodiona, começando com a concentração recomendada para uso (150 mL/100 Litros de água) (Anexo B). Nesses testes piloto, utilizamos números reduzidos de ovos (seis controles e seis tratados), para minimizar a necessidade de embriões.

No primeiro teste (Tabela 1 do Anexo B) utilizamos a concentração de uso (1,5 µL/mL), e 12 ovos foram utilizados, sendo seis controles e seis tratados. Nesse caso, observamos que cinco embriões controles e cinco tratados estavam vivos, e um ovo em cada tratamento não possuía embrião. Neste teste, a balança estava com problemas e não foi possível estimar o peso.

No segundo teste (Tabela 2 do Anexo B) utilizamos o dobro da concentração de uso (3 µL/mL), e 12 ovos foram utilizados, sendo seis controles e seis tratados. Observamos que dos seis controles, todos estavam vivos e, dos seis tratados, quatro estavam vivos, um não tinha embrião e 1 embrião estava morto.

O terceiro teste (Tabela 3 do Anexo B) consistiu de três diferentes concentrações: 6, 12 e 24 µL/mL, utilizando seis ovos para cada um, assim como seis ovos controles. Observamos dentro dos controles dois embriões mortos e quatro vivos. Na primeira concentração, todos estavam vivos e um dos embriões estava com aparência anormal. Na segunda concentração, cinco embriões estavam vivos. Na terceira concentração, quatro

embriões estavam vivos. Como ainda estávamos longe de 50% de mortalidade, seguimos dobrando a concentração.

O quarto teste (Tabela 4 do Anexo B) consistiu de duas concentrações: 48 e 96 $\mu\text{L/mL}$, sendo cinco ovos para cada tratamento, incluindo dois controles. Neste teste, observamos que os dois controles não estavam galados. Dos ovos da primeira concentração, dois não estavam galados e três estavam vivos, sendo que um deles apresentava malformações em seu corpo, nos olhos e tinha tamanho reduzido. Dos ovos da segunda concentração apenas um não estava galado, dois estavam vivos e dois mortos com malformações cardíacas, hemorragia e pernas malformadas. Todas as hemorragias foram observadas no momento da coleta. Apesar do baixo número de amostras, pela primeira vez observamos metade dos embriões vivos e metade mortos.

Dessa forma, no quinto teste (Tabela 5 do Anexo B) repetimos a dose anterior de 96 $\mu\text{L/mL}$, utilizando dois controles e dez tratados, devido ao resultado promissor encontrado. Ambos ovos controles apresentaram embriões vivos. Dos tratados, três ovos não estavam galados, três vivos, sendo que um deles apresentava tamanho reduzido e malformação ocular (diferença no tamanho dos olhos), e quatro embriões mortos, sendo que um desses ovos apresentava apenas vestígios de sangue, sem embrião distinguível e os outros tinham algum tipo de malformação, como cauda encurtada, malformação dos membros, diferença ocular e hemorragia.

Para o sexto teste (Tabela 6 do Anexo B) utilizamos novamente a concentração de 96 $\mu\text{L/mL}$, com um maior número de ovos, sendo dois controles e 22 tratados. Ambos controles estavam vivos. Dos tratados, cinco não tinham embrião, dez estavam vivos, sendo que dois apresentavam malformações como diferença ocular, e sete estavam mortos, alguns apresentando hemorragia e malformações em seu corpo. Observamos então que essa concentração poderia ser aproximada da LD_{50} . Decidimos dobrar essa concentração para estabelecer exatamente a faixa da LD_{50} .

No sétimo teste utilizamos a concentração de 192 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 7 do Anexo B) com 24 ovos controles e 36 tratados de um novo fornecedor (grande produtor). Dos controles, observamos que 17 estavam vivos e em um o olho não desenvolveu corretamente, três ovos não tinham embrião e quatro estavam mortos, apresentando malformações. Dos embriões tratados, 21 não tinham embrião, oito estavam mortos e sete estavam vivos. Diante

desse resultado, ficamos na dúvida se os ovos estavam inférteis ou se a concentração elevada de agrotóxico não permitiu a retomada do desenvolvimento, e foi necessária nova mudança de fornecedor.

Com o tempo de estudo reduzido devido ao atraso pelas mudanças de fornecedor, decidimos voltar a uma concentração mais próxima do 96 $\mu\text{L/mL}$, e realizamos um teste com ovos de um novo fornecedor com 120 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 8 do Anexo B), com três controles e 21 tratados. Dos controles, um não tinha embrião e os outros dois estavam vivos, porém um apresentava malformações oculares (novamente diferença de tamanho) e o encéfalo estava amassado. Dos ovos tratados, 15 não tinham embriões, mas a maioria aparentava estar fertilizado, quatro estavam vivos e dois mortos. Com a dúvida da fertilidade dos ovos, resolvemos realizar um teste incluindo ovos sem nenhum tratamento.

Nesse novo teste, a concentração foi diminuída, desta vez para 100 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 9 do Anexo B), utilizando 12 ovos sem tratamento algum, 12 controles e 12 tratados. Dos ovos sem tratamento, observamos que quatro não tinham nada, cinco estavam vivos e três mortos. Dos controles, seis estavam vivos, quatro sem embrião e dois mortos. Nos tratados, oito não tinham embrião e quatro estavam mortos. Através dos controles e normais, observamos que muitos ovos não estavam viáveis, assim optou-se novamente pela mudança de fornecedor.

A concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$ foi repetida (Tabela 10 do Anexo B), usando seis ovos controles e 17 tratados. Observamos que três embriões controles estavam vivos, sendo que um apresentava uma estrutura anormal no coração; um dos ovos não tinha embrião e dois estavam mortos. Dos tratados, quatro não tinham embrião, oito estavam vivos (um contendo anormalidade no coração e outro com hemorragia e estrias vermelhas pelo corpo) e cinco estavam mortos (um deles apresentando hemorragia). Com esses resultados, deliberamos que a concentração próxima de 100 $\mu\text{L/mL}$ poderia representar a LD_{50} .

Para testar essa hipótese da LD_{50} , realizamos três experimentos com concentrações próximas (83,3, 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$) com um número maior de amostras.

Inicialmente, utilizamos a concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 11 do Anexo B), numa amostra de 13 controles e 23 tratados. Observamos nos controles que haviam três embriões mortos, cinco vivos e cinco ovos não galados. Para os tratados, encontramos oito mortos, nove não tinham embrião e seis vivos.

Em seguida usamos uma concentração menor de 83,3 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 12 do Anexo B), com 12 controles e 12 tratados. Dos controles, observamos que cinco não apresentavam embrião e não tinham aparência de estarem galados, cinco estavam vivos e dois mortos (um deles com hemorragia). Dos tratados, sete não tinham embrião, quatro vivos e um morto. Devido à baixa fertilidade, decidimos repetir o experimento. Para esse novo teste (Tabela 13 do Anexo B) incubamos seis ovos sem tratamento, 15 controles e 15 tratados. Neste teste, observamos que dois ovos não tratados não tinham embrião e quatro estavam vivos. Dos controles, 13 estavam vivos, um não tinha embrião e um estava morto. Dos tratados, seis estavam mortos, oito vivos e um não tinha nada.

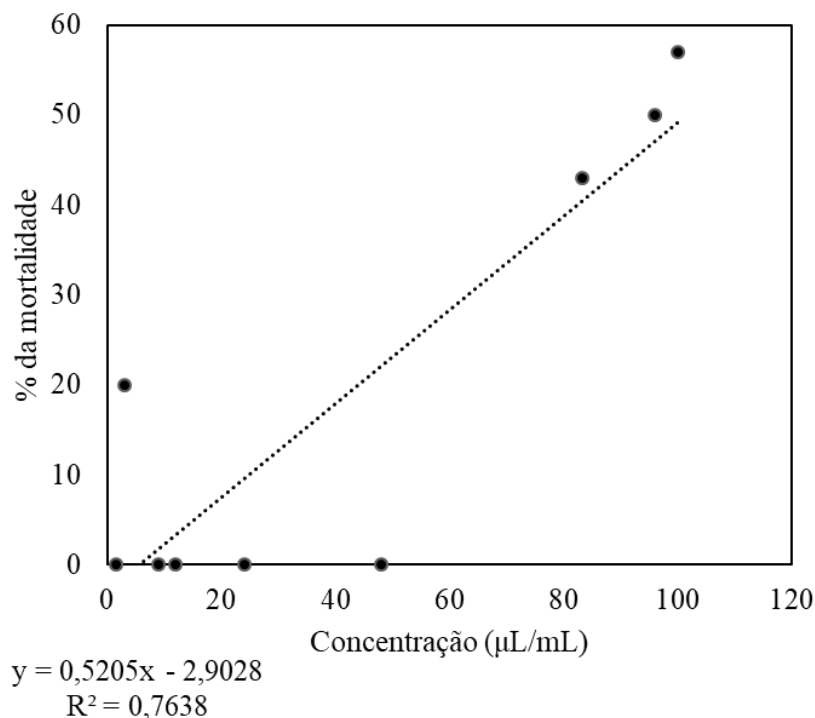
Finalmente utilizamos a concentração de 93,3 $\mu\text{L/mL}$ (Tabela 14 do Anexo B), com cinco ovos sem tratamento, 15 controles e 15 tratados. Dos sem tratamento, observamos quatro vivos e um ovo sem embrião. Dos controles, dois estavam mortos, dois ovos sem embrião, e 11 vivos. Os tratados apresentaram sete embriões vivos, cinco mortos e três ovos não tinham embrião.

Uma vez que a porcentagem de mortalidade dos tratamentos realizados com 83,3, 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$ se aproximou de 50%, conforme pode ser visto na Tabela 1, consideramos que estas três concentrações são o intervalo da LD_{50} . Ao confeccionarmos um gráfico linear com equação da reta (Gráfico 1) a partir dos dados obtidos com os experimentos mencionados acima, conseguimos estimar o valor aproximado da LD_{50} em 101,6 $\mu\text{L/mL}$, valor esse bem próximo do 100 $\mu\text{L/mL}$ que havíamos encontrado com os experimentos práticos. Sendo assim, podemos afirmar que a LD_{50} para iprodiona em embriões de galinha tratados através de injeção é de aproximadamente 100 $\mu\text{L/mL}$.

Tabela 1 – Mortalidade dos embriões (em porcentagem) segundo diferentes concentrações de tratamentos com iprodiona e respectivos controles.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Tratado			Controle		
	83,3	93,3	100	83,3	93,3	100
Mortalidade	6	5	8	1	2	2
% da mortalidade	43	42	57	7	15	25

Gráfico 1 – Estimativa da LD₅₀ segundo as taxas de mortalidade em função das diferentes concentrações de iprodiona testadas ao longo do experimento.



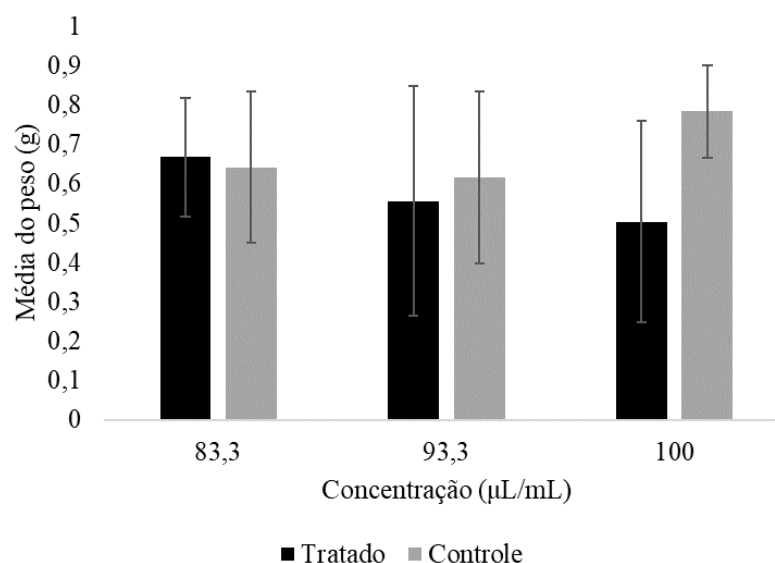
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES TRATADOS COM IPRODIONA EM SUA LD₅₀

Os embriões tratados com iprodiona no intervalo da LD₅₀ bem como os embriões controles foram inicialmente pesados, assim que retirados do ovo, como mostrado nas Tabelas de 1 a 14 do Anexo B. Calculamos a média e o desvio padrão para o peso dos embriões, como apresentado na Tabela 2 e representados graficamente no Gráfico 2. Utilizando o teste de Kruskal-Wallis não encontramos diferença significativa para o peso dos embriões vivos tratados em relação aos controles (K-W; $h = 6,705$; $p = 0,2435$), o que significa que os embriões vivos tratados conseguiram se desenvolver da mesma forma que os controles, no que diz respeito ao peso total do corpo.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos pesos dos embriões encontrados vivos para diferentes concentrações de tratamentos com iprodiona e respectivos controles.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Tratado			Controle		
	83,3	93,3	100	83,3	93,3	100
Média (g)	0,667788	0,556380	0,503717	0,642585	0,616808	0,784040
Desvio Padrão (g)	0,151579	0,292759	0,256627	0,193568	0,217852	0,116994

Gráfico 2 – Média e desvio padrão dos pesos dos embriões encontrados vivos para diferentes concentrações de tratamentos com iprodiona e respectivos controles.



Em seguida, analisamos os embriões na lupa e a ocorrência de malformações na morfologia externa foi contabilizada. Dentro do intervalo utilizado como LD_{50} , a concentração de $83,3 \mu\text{L/mL}$ apresentou dois embriões (um tratado e outro controle) com malformações (Tabela 3). O embrião controle apresentou hemorragia no encéfalo e diferença ocular, com o olho esquerdo menor que o direito (Figura 2A). O outro embrião tratado possuía o corpo com aparência anormal (Figura 2B). A concentração de $93,3 \mu\text{L/mL}$ (Tabela 4) apresentou cinco embriões com alguma malformação, sendo um controle e quatro tratados. O embrião controle apresentava hemorragia no encéfalo irradiada para o tronco (Figura 2C). Dos embriões tratados, um não apresentou bico e possuía o encéfalo visivelmente diminuído (Figura 2D). Outros dois possuíam hemorragia no encéfalo e no lado direito do corpo (Figuras 3A e 3B, respectivamente), e outro possuía a formação ocular esquerda mais atrasada (Figura 3C). Por fim, a concentração de $100 \mu\text{L/mL}$ (Tabela 5) apresentou dois embriões com malformações, ambos tratados. Um deles apresentou hemorragia no encéfalo, membros inferiores não desenvolvidos e diferença ocular (sendo o olho esquerdo menor que o direito) (Figura 3D). O

outro embrião apresentou possíveis defeitos cardíacos. Todas as malformações observadas nesse estudo estão resumidas na Tabela 6.

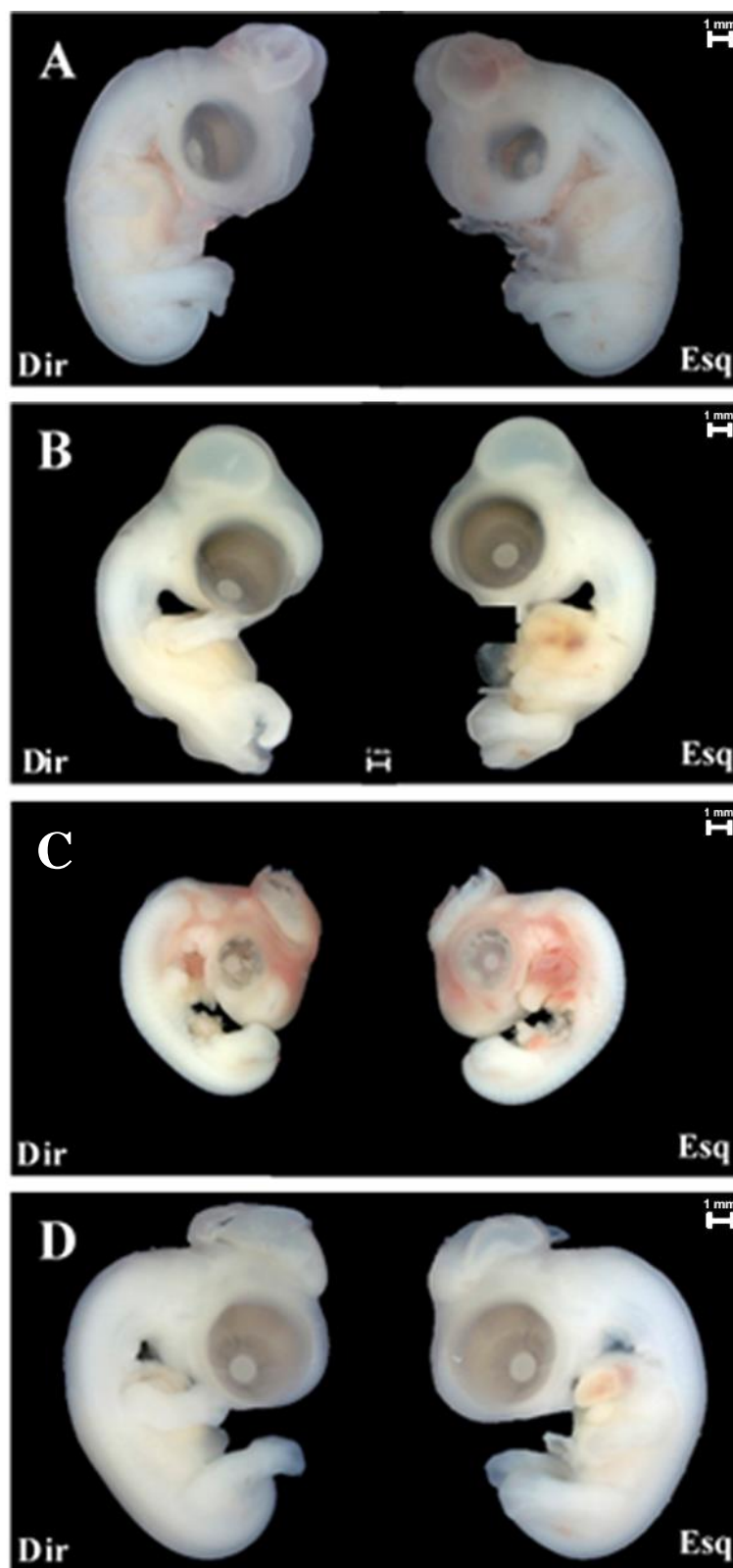


Figura 2 – Embriões com malformações. Dir – lado direito; Esq – lado esquerdo; A – embrião controle com hemorragia no encéfalo e diferença ocular; B – embrião tratado com corpo de aparência anormal; C – embrião controle com hemorragia no encéfalo irradiada para o tronco; D – embrião tratado sem bico e com encéfalo visivelmente diminuído.

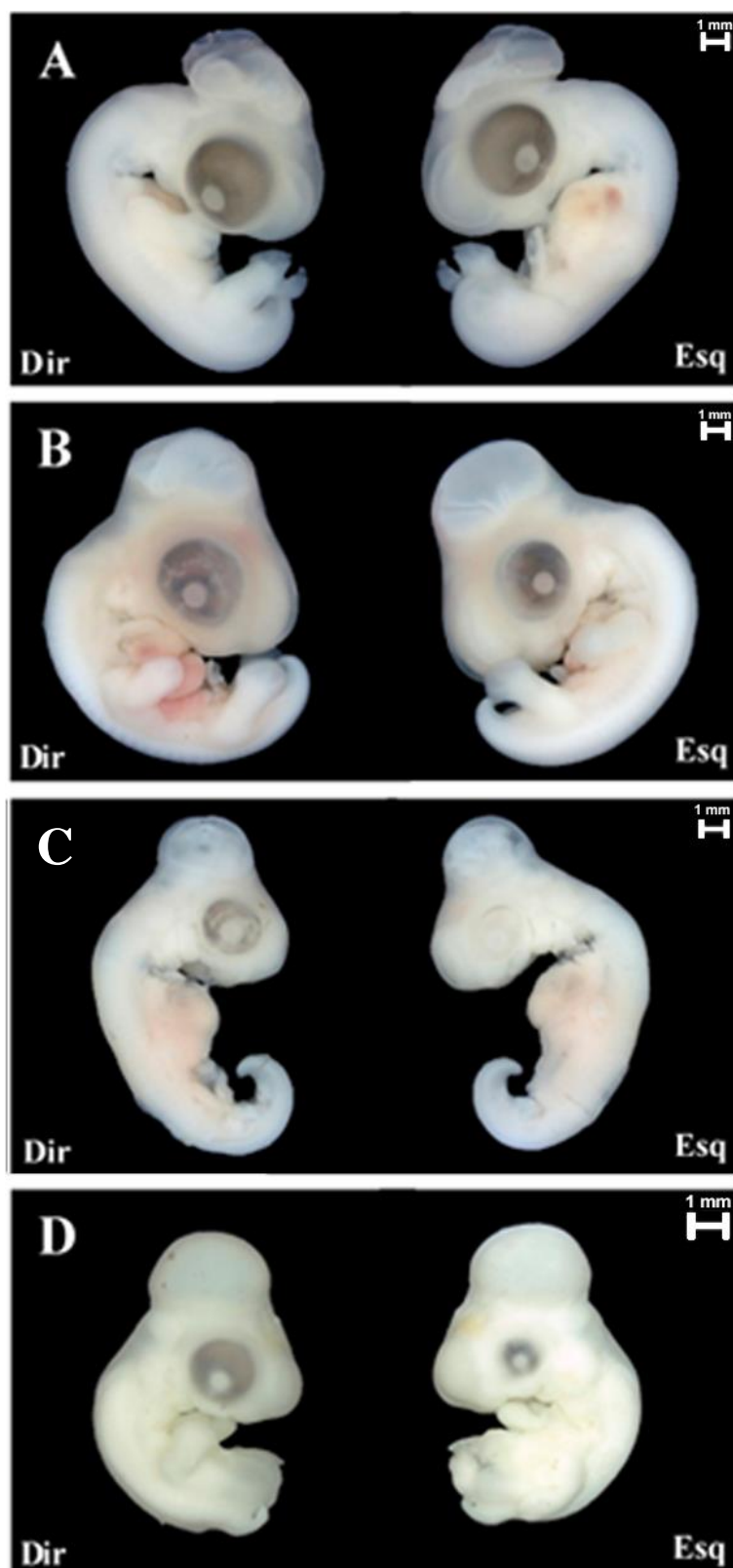


Figura 3 – Embriões com malformações. Dir – lado direito; Esq – lado esquerdo; A - embrião tratado com hemorragia; B – embrião tratado com hemorragia; C – embrião tratado com diferença ocular; D – embrião tratado com hemorragia no encéfalo, membros inferiores não desenvolvidos e diferença ocular.

Tabela 3 – Malformações dos embriões em 83,3 $\mu\text{L/mL}$.

Embrião	Malformações
7 _C	Hemorragia no encéfalo; diferença ocular (olho esquerdo menor que o direito)
25 _T	Vivo, corpo retorcido

Tabela 4 – Malformações dos embriões em 93,3 $\mu\text{L/mL}$.

Embrião	Malformações
12 _C	Hemorragia no encéfalo irradiada para o tronco
25 _T	Formação ocular esquerda atrasada
27 _T	Sem bico; encéfalo visivelmente diminuído
32 _T	Hemorragia no encéfalo
35 _T	Hemorragia lado direito do corpo

Tabela 5 – Malformações dos embriões em 100 $\mu\text{L/mL}$.

Embrião	Malformações
20 _T	Hemorragia no encéfalo; membros inferiores não desenvolveram; diferença ocular (olho esquerdo menor que o direito)
22 _T	Possíveis problemas cardíacos

Tabela 6 – Malformações em embriões submetidos à LD₅₀ e controles.

	Tratado	Controle
Hemorragia	10	4
Malformação ocular	5	3
Bico	1	0
Malformação na parte caudal do corpo	1	0
Coração	3	0
Encéfalo	0	1
Malformações no embrião em geral	10	2
Total de malformações	30	10

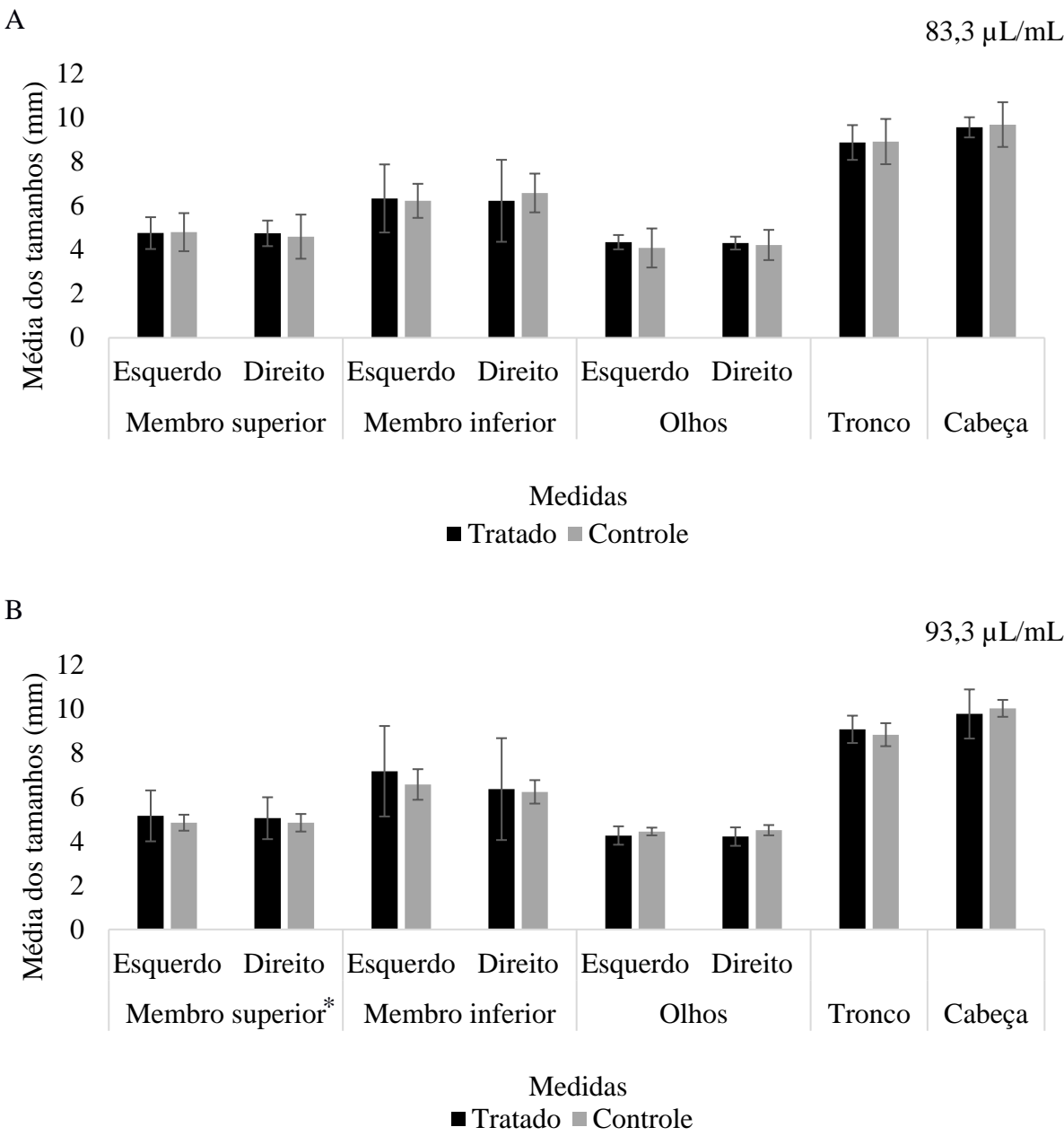
4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE EMBRIÕES TRATADOS COM IPRODIONA EM SUA LD₅₀

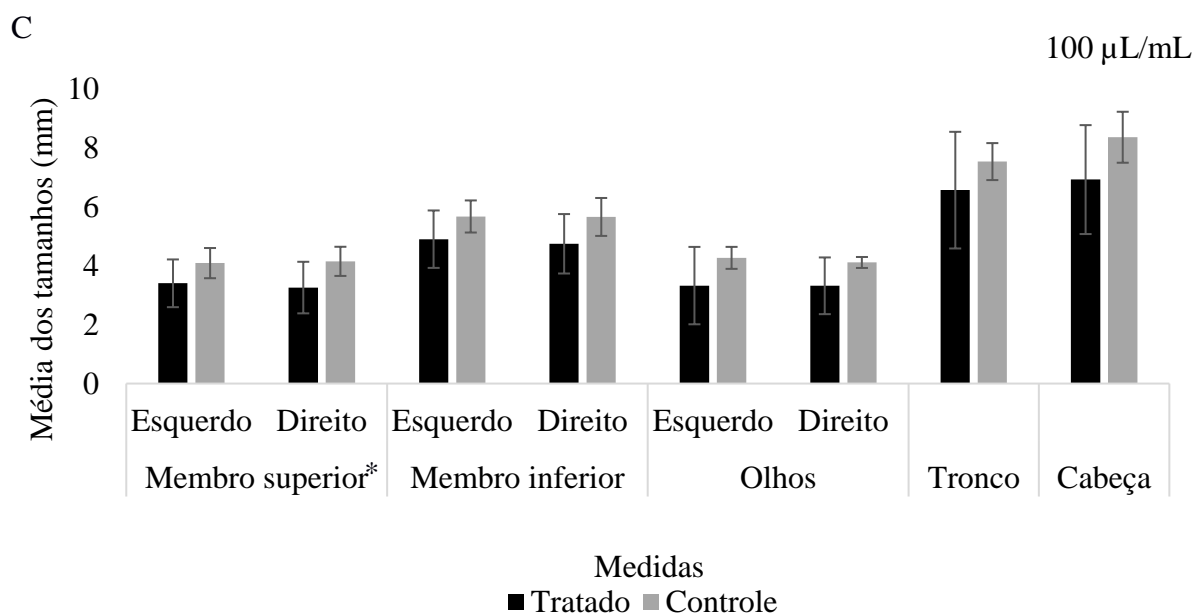
Primeiramente realizamos uma análise para verificar se as três concentrações poderiam ser consideradas como um conjunto só de dados, no que diz respeito à morfometria. Ao compararmos todos os tratamentos usando as medidas de 83,3 µL/mL, 93,3 µL/mL e 100 µL/mL, que podem ser visualizadas nas tabelas 15, 16 e 17 do Anexo B, respectivamente, com o teste de MANOVA, encontramos uma diferença significativa entre os três grupos de tratamentos ($f = 2,585$, $p = 0,0233$). Ao analisarmos com o teste a posteriori par-a-par de Hotelling's, constatamos que o tratamento de 100 µL/mL apresentava diferença significativa em relação aos outros dois tratamentos. Dessa forma, decidimos seguir as análises considerando os três grupos separadamente.

Em seguida, analisamos as diferentes medidas de cada lado (esquerdo e direito) obtidas para cada concentração com relação ao seu controle. Para as análises de tamanho, encontramos diferença significativa apenas para o tratamento de 93,3 µL/mL para o olho direito (M-W; $z = -0,1994$; $p = 0,0462$). Neste caso, a média do olho direito do grupo controle era maior do que o direito do grupo tratado. Os demais dados podem ser consultados na Tabela 18 do Anexo B.

Posteriormente, analisamos se os embriões tratados com iprodiona em sua LD₅₀ apresentaram maior assimetria entre os lados esquerdo e direito, em relação a olhos e membros (superiores e inferiores). Para tanto, calculamos a diferença de tamanho das estruturas pareadas em módulo (ou seja, sem valor negativo ou positivo, apenas a diferença). Testamos os valores de módulo (Tabela 19 do Anexo B) quanto à sua normalidade e, diante dessa, testamos por teste t ou Mann-Whitney. As análises indicaram diferença significativa apenas para os membros superiores dos tratamentos com 93,3 µL/mL (M-W; $z = -2,724$; $p < 0,001$) (Gráfico 3B) e 100 µL/mL (M-W; $z = -2,298$; $p = 0,0216$) (Gráfico 3C). Logo, os tratamentos com 93,3 e 100 µL/mL resultaram em uma assimetria dos membros superiores dos embriões, quando comparados ao controle. As demais análises podem ser consultadas na Tabela 20 do Anexo B.

Gráfico 3 – Média e desvio padrão do tamanho das medidas de acordo com as concentrações e em relação à simetria bilateral.





* - houve diferença significativa ($p < 0,05$)

Por fim, analisamos os embriões quanto ao seu estágio de desenvolvimento segundo Hamburger & Hamilton (1951). Os embriões mortos que puderem ser analisados apresentaram estágio de desenvolvimento de HH21 a HH29, o que corresponde a períodos de três a seis dias de desenvolvimento. Os embriões que sobreviveram variaram do estágio HH26 ao HH32, o que corresponde a períodos de quatro dias e meio a sete dias e meio de desenvolvimento. Ao compararmos os estágios de desenvolvimento dos embriões vivos tratados com os controles, através do teste de Mann-Whitney, verificamos que não houve diferença significativa, ou seja, os embriões que sobreviveram ao tratamento se desenvolveram de forma semelhante aos embriões controle (Tabela 21 do Anexo B).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi testada a toxicidade aguda causada pelo fungicida iprodiona em embriões de galinha. O valor encontrado como dose letal média (LD_{50}) foi de aproximadamente 100 $\mu\text{L/mL}$, o que representa 67 vezes a concentração recomendada para uso. Conforme mencionado anteriormente, a toxicidade aguda se dá pela exposição a altas concentrações de um agente químico de forma rápida, conforme realizado no presente trabalho. Esse tipo de exposição é mais provável de acontecer em casos acidentais. Por outro lado, a contaminação crônica é resultado de exposição repetida de doses baixas, por longos períodos de tempo, sendo mais difícil de ser relacionada diretamente aos efeitos na saúde (Londres, 2011). Esse tipo de situação é mais comumente observada (Keifer & Firestone, 2007), e representa uma situação mais real de possível contaminação. Assim, futuramente será interessante testar os efeitos crônicos causados pela exposição ao iprodiona em embriões expostos a concentrações menores por longos períodos de tempo.

É importante ressaltar que o valor da LD_{50} (100 $\mu\text{L/mL}$) foi encontrado a partir de duas metodologias diferentes: experimentalmente, aumentando-se a concentração de iprodiona até se observar 50% de mortalidade, e através do cálculo da equação da reta a partir dos resultados observados em várias concentrações. Dessa forma, apesar do número amostral ser relativamente pequeno, necessitando novos experimentos para confirmação, o resultado apresenta bastante confiança.

O teste da LD_{50} é utilizado desde 1927 e determina a dose que mata 50% da população com um mínimo de erro relativo ao medir o potencial de intoxicação aguda (Trevan, 1927). A LD_{50} é importante pois nos permite comparar a potência ou intensidade tóxica de diferentes produtos químicos (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2013). Diversos outros trabalhos utilizando a mesma metodologia abordada neste estudo conseguiram chegar à LD_{50} de outros tipos de agrotóxicos em aves, como malation e furadan em 50 $\mu\text{g/mL}$ (Datta, 2008) e endosulfan em 28 mg/ovo (Mobarak & Al-Asmari, 2011).

Os embriões tratados com iprodiona em sua LD_{50} e que sobreviveram apresentaram um desenvolvimento normal a partir da análise do peso total do corpo e do estágio de desenvolvimento. Entretanto, foram observadas algumas malformações durante a procura da LD_{50} e no intervalo utilizado como LD_{50} , dentre elas alterações dos olhos, dos membros e hemorragias foram as mais comuns.

A formação ocular é um processo muito complexo que envolve diversas vias de sinalização e fatores de transcrição (Gilbert & Barresi, 2016). Dois componentes participam desse processo: o ectoderma de superfície e o epitélio do diencéfalo (no cérebro anterior). Esses dois tecidos conversam em uma cascata recíproca de sinalizações que resulta na formação da retina (formada a partir do epitélio do diencéfalo) e do cristalino (formado a partir do ectoderma de superfície adjacente). O primeiro passo ocorre na parte anterior do tubo neural, onde as vias BMP e Wnt são inibidas, e a expressão de *Otx2* é permitida (uma vez que BMPs a bloqueiam normalmente). *Otx2* se acumula na porção ventral da cabeça o que resulta na ativação do gene *ET*. Uma vez ativado *ET*, leva à expressão de *Rx*, que induz a expressão de *Pax6*, molécula chave na determinação do campo ocular. A *Rx* também ativa o gene *Nlcam*, ocasionando a evaginação das células precursoras da retina no diencéfalo. Essas evaginações tornam-se as vesículas ópticas que, ao entrarem em contato com o ectoderma da superfície, se achatam contra o mesmo e produzem BMP4, Fgf8 e Delta. As células do ectoderma da superfície são competentes para receber essa sinalização devido à atividade do gene *Pax6*, e se alongam tornando-se células do placóide da lente e secretando FGFs, o que resulta na ativação do gene *Vsx2* pelas células adjacentes da vesícula óptica, que são instruídas a se tornarem a retina neural. Enquanto isso, o mesênquima dérmico que circunda a vesícula óptica envia sinais para a maioria das células vesiculares óticas externas para ativar o gene *Mitf* o que resulta na produção do pigmento melanina. Falha na expressão de *Mitf* na retina pigmentada evita que esta estrutura se diferencia completamente, o que causa uma malformação que resulta na drenagem do humor vítreo. Sem este fluido, o olho não aumenta e as lentes e córneas são, portanto, menores (Gilbert & Barresi, 2016).

Alguns embriões testados no presente trabalho tanto na procura da LD₅₀ quanto no intervalo utilizado como LD₅₀ apresentaram problemas no desenvolvimento ocular esquerdo (microftalmia). De modo semelhante, outros trabalhos com agrotóxicos em aves também apresentaram malformações oculares, como o dissulfeto de tetra metil tiuram, o monossulfeto de tetra metil tiuranmonossulfito e o dissulfeto de tetra etil tiuram, que causaram malformações no cálice do olho (diminuição ocular) e defeitos na lente e córnea (Korhonen et al., 1982). Porém, diferente do apresentado neste trabalho, a maioria dos casos de malformações oculares ocorreram no olho do lado direito da cabeça. Com o endosulfan, Mobarak & Al-Asmari (2011) encontraram diferenças significativas de redução do diâmetro ocular em embriões de galinha quando comparados ao controle. Wyttenbach & Thompson (1985) explicaram em seu trabalho utilizando o agrotóxico malation em embriões de galinha que os

defeitos na lente e no cálice óptico observados, e consequente diminuição no diâmetro do olho, podem ser explicados pela área de contato insuficiente entre a vesícula óptica e o ectoderma subjacente. De modo semelhante, Paganelli et al. (2010) observaram casos de microftalmia em seu animal modelo (*Xenopus laevis*) quando tratados com herbicidas baseados em glifosato. Segundo eles, foi observada diminuição na expressão anterior do gene *Shh*, sinalizador responsável por determinar o aparecimento dos olhos em dois hemisférios separados. Além disso, foi reportada redução na expressão anterior do gene *Otx2*, causada possivelmente por um aumento na sinalização por ácido retinóico. É possível especular que falhas desse tipo tenham sido responsáveis pela microftalmia unilateral observada nos embriões de galinha tratados com iprodiona, uma vez que as moléculas responsáveis pela formação dos olhos são altamente conservadas (Gilbert & Barresi, 2016). Experimentos futuros serão necessários para analisar os padrões de expressão dessas moléculas e verificar essa hipótese.

Além dessa assimetria observada para o crescimento ocular (apesar de não estatisticamente significativa), foi constatado que embriões de galinha tratados com iprodiona nas concentrações de 93,3 µL/mL e 100 µL/mL apresentaram assimetria lateral quanto ao tamanho dos membros superiores.

Os membros são estruturas formadas a partir de brotamentos formados em uma região somática sinalizada como o campo dos membros (Gilbert & Barresi, 2016). Esse campo receberá células mesenquimais de duas regiões: do mesoderma lateral, formando as células precursoras do esqueleto dos membros, e dos somitos, que estabelece as células precursoras dos músculos dos membros. A acumulação dessas células sob o tecido ectodérmico cria os brotos dos membros. As células de mesoderma lateral secretam Fgf10, responsável por iniciar a sequência de interações entre ectoderma e mesoderma para a formação do novo membro. A presença de Fgf10 induz a expressão de proteínas Wnt no ectoderma adjacente, que passa a secretar Fgf8. A partir daí, o ectoderma de superfície se alonga para formar uma crista ectodérmica apical (ou AER, do inglês, *apical ectodermal ridge*), que é fonte de secreção de Fgfs para crescimento e padronização dos membros. Os genes *Hox* regulam a expressão do ácido retinoico, que, por sua vez, induz a expressão de *Tbx5* para iniciar o campo dos membros anteriores, e *Tbx4* para os membros posteriores. O crescimento e diferenciação proximal-distal se dá por uma série de interações entre a AER e o mesênquima imediatamente abaixo, chamado zona de progresso (PZ, do inglês, *progress zone*), cuja alta taxa de proliferação permite o crescimento dos membros. A diferenciação dos dedos no seu eixo antero-posterior se dá através da sinalização *Shh*, que é expresso na zona de atividade polarizante (ZPA, do inglês, *zone of*

polarizing activity), imediatamente inferior à AER (na futura região posterior do membro). Eventualmente, surgem os moldes mesenquimatosos dos ossos e o esqueleto formado é apenas cartilaginoso. A formação dos ossos longos se inicia a partir de ossificação endocondral e ocorre apoptose nos tecidos das regiões interdigitais através de sinais das proteínas BMP. Após a formação dos ossos longos, surgem grandes massas de músculos, provenientes de mioblastos que migraram da região do miótomo para popular o membro em crescimento (Gilbert & Barresi, 2016).

Assim como no presente trabalho, uma assimetria entre os membros superiores foi observada por Mobarak & Al-Asmari (2011), quando embriões de aves foram tratados com endossulfan. Uma diminuição no tamanho dos membros superiores foi causada por tratamento com endrina (Seifert, 1989) e como consequência de hipoglicemia (Arsenault et al., 1975; Laley & Gibson, 1977). De fato, alguns agrotóxicos, como o malation, aumentam a quantidade de tecido alfa e beta das ilhotas de Langerhans causando, assim, aumento da produção de insulina, que interfere no metabolismo de carboidratos, resultando em um crescimento reduzido nas cartilagens dos membros e contribuindo para uma diminuição no tamanho dos membros durante o desenvolvimento (Arsenault & Gibson, 1974; Kalender et al., 2004; Panahi et al., 2006). Dessa forma, será interessante testar, futuramente, se o tratamento com iprodiona resulta em alterações na glicemia dos embriões de aves, e, como consequência, malformações na formação dos membros.

A assimetria observada no presente trabalho se enquadra no conceito de assimetria flutuante, que é caracterizada por pequenos desvios aleatórios da perfeita simetria em traços simetricamente bilaterais. Esse tipo de alteração foi reportado em diversos grupos animais como pássaros (Møller, 1994), Odonata (Hardersen & Wratten, 1998), peixes (Allenbach et al., 1999) e moscas (Floate & Fox, 2000) como sendo causada por estresse ambiental ou genético (Møller & Pomiankowski, 1993) durante o período do desenvolvimento, como por exemplo, a exposição à agrotóxicos. Esta alteração na simetria dos animais (ou mesmo plantas) causada por estresse de origem antropogênica possibilita o uso da assimetria flutuante como bioindicador, como demonstrado em revisão de Beasley et al. (2013). Como consequência, os animais gastam mais energia lidando com o estresse e acabam perdendo a simetria perfeita do corpo, assim como acarretam uma diminuição no potencial de sobrevivência, pois a capacidade em tolerar novos desafios ambientais está comprometida (Depledge & Fossi, 1994). Para os animais, essa assimetria tem um impacto negativo principalmente na seleção sexual, onde a assimetria de partes do corpo ocasiona uma

diminuição na capacidade de combate, como a assimetria de garras, esporões ou chifres (Møller, 1992), diminui a seleção por fêmeas que preferem os machos mais simétricos e a diminuição na habilidade de vôo, forrageamento e ornamentação da cauda quando esta é assimétrica, como ocorre em *Nectarinia johnstoni* e *Hirundo rustica* (Evans & Thomas, 1992; Møller & Pomiankowski, 1993). Em humanos, a pesquisa de Gangestad et al. (1994) demonstrou que a atratividade facial masculina foi correlacionada positivamente com a simetria do rosto.

Além das alterações relatadas acima, hemorragias foram bastante observadas nos embriões tratados com iprodiona. As hemorragias ocorrem pela saída de sangue do sistema cardiovascular (Coelho, 2002). Esse sistema se desenvolve em resposta à sinalização de BMPs do endoderma, que induzem a síntese de Fgf8 para a expressão de proteínas cardíacas (Gilbert & Barresi, 2016). No mesoderma lateral esplâncnico da região cranial aparece um par de cordões endoteliais que formam os tubos endocárdicos. Esses tubos se fusionam quando ocorre o dobramento lateral do embrião, formando um coração tubular. Esse coração origina quatro câmaras cardíacas primitivas: bulbo cardíaco, ventrículo primitivo, átrio primitivo e seio venoso. O coração se dobra sobre si formando uma alça e, a medida que o tubo se alonga e encurva, ele penetra na parede dorsal da cavidade pericárdica. Enquanto os tubos cardíacos se fundem, o mesênquima esplâncnico forma o manto miopericárdico, que se diferenciam em mioblastos e formam o miocárdio e o epicárdio (Moore et al., 2012). Os vasos sanguíneos se formam através de diversas sinalizações de BMP, Wnt e Notch que ativam o fator de transcrição Etv2 nas células da placa do mesoderma lateral, originando os hemangioblastos das ilhotas sanguíneas. Essas células originarão precursores das células sanguíneas (através do *Runx-1* ativado pelo Notch) e endotélios (respondendo à *Hoxa-3*). A formação dos vasos sanguíneos ocorrerá tanto pela vasculogênese intraembrionária, com a formação da aorta dorsal e conexão dos vasos com redes capilares, como pela vasculogênese extraembrionária, onde as ilhotas sanguíneas formadas por hemangioblastos darão origem à vasculatura inicial. A hematopoese intraembrionária inicia nas ilhotas no mesoderma lateral esplâncnico associado com a parede ventral da aorta dorsal, logo depois na região AGM (aorta-gônadas-mesonéfrons). As células-tronco hematopoéticas dessa região migram para o saco vitelino, a placenta e o fígado. Posteriormente, o fígado substitui o saco vitelino como principal fonte de hemácias e, no fim do período embrionário, células-tronco hematopoéticas do fígado colonizam o baço e esses dois órgãos são os principais sítios de hematopoese. No final, a função da atividade hematopoética é designada à medula óssea. Na vasculogênese extraembrionária, os hemangioblastos são estimulados pelo VEGF-A do mesoderma a formar os plexos capilares primários. No tronco e

nas extremidades o mesoderma e o revestimento endotelial associados constituem a parede vascular. Na cabeça e em áreas do sistema arco aórtico, o mesênquima da crista neural fornece o tecido conjuntivo e o músculo liso dos vasos sanguíneos (Gilbert & Barresi, 2016).

Hemorragias em embriões tratados com agrotóxicos já foram reportadas por Pamanji et al., (2015) em *Danio rerio* exposto a água com monocrotofós, em embriões de galinha quando emergidos em carbosulfan (Mathur et al., 2013) e em embriões de *Pimephales promelas* tratados com 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (Olivieri & Cooper, 1997). Ensaios futuros devem ser realizados no intuito de compreender de que maneira o iprodiona causa perturbação no desenvolvimento do sistema cardiovascular.

Por fim, é importante novamente ressaltar que, através do conhecimento dos efeitos da iprodiona sobre o desenvolvimento embrionário de galinhas, pode-se verificar os riscos que o uso desse agrotóxico representa à biodiversidade e também à saúde humana, uma vez que aves e mamíferos compartilham diversas vias de sinalização durante os processos do desenvolvimento, e as malformações observadas nos embriões de galinha indicam potenciais riscos para seres humanos, especialmente gestantes, em contato com a iprodiona.

6 CONCLUSÕES

- A dose letal média (LD_{50}) para embriões de galinha submetidos à injeção única com iprodiona no dia zero é de aproximadamente 100 $\mu\text{L/mL}$, o que corresponde a 67 vezes a dose recomendada de uso.
- A LD_{50} do iprodiona não causou alterações no peso total e nem no estadiamento dos embriões que sobreviveram ao tratamento, até o dia sete do desenvolvimento.
- Os embriões que não sobreviveram ao tratamento com iprodiona em sua LD_{50} não passaram de seis dias de vida.
- Tratamento com iprodiona em sua LD_{50} levou a alterações morfológicas em 13% ($n = 7$) dos embriões, sendo em sua maioria hemorragias e diferenças oculares somente do lado esquerdo. Em menor proporção, membros não desenvolvidos, problemas cardíacos, ausência de bico, encéfalo visivelmente diminuído e corpo com aparência retorcida foram reportados.
- Tratamento com iprodiona em sua LD_{50} levou a alterações morfométricas nos embriões tratados quanto ao tamanho do olho direito (menor nos tratados) na concentração de 93,3 $\mu\text{L/mL}$ e a assimetria dos membros superiores nas doses 93,3 e 100 $\mu\text{L/mL}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVANJA, M. C. R.; SAMANIC, C.; DOSEMECI, M.; LUBIN, J.; TARONE, R.; LYNCH, C. F.; KNOTT, C.; THOMAS, K.; HOPPIN, J. A.; BARKER, J.; COBLE, J.; SANDLER, D. P.; BLAIR, A. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 9, p. 800-814, 2003.
- ALLENBACH, D. M.; SULLIVAN, K. B.; LYDY, M. J. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 18, n. 5, p. 899-905, 1999.
- ANVISA. **Divulgado monitoramento de agrotóxicos em alimentos**. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409_1.htm>. Acessado em: 18 de set de 2016.
- ANVISA. **Nota técnica: Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo da parationa metílica**. 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117842/Nota%20t%25C3%25A9cnica%20da%20Parationa%20Met%25C3%25ADlica.pdf/8dd0de39-8d7a-4191-8b1c-872279bd6040?version=1.0>>. Acessado em: 20 de nov. de 2017.
- ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 309-313, jun. 2000.
- ARBUCKLE, T. E.; LIN, Z.; MERY, L. S. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in em Ontario farm population. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 8, p. 851, 2001.
- ARSENAULT, A. L.; GIBSON, M. A. Histogenesis of the islets of Langerhans in malathion-treated chick embryos. **Canadian journal of zoology**, v. 52, n. 12, p. 1541-1544, 1974.
- ARSENAULT, A. L.; GIBSON, M. A.; MADER, M. E. Hypoglycemia in malathion-treated chick embryos. **Canadian journal of zoology**, v. 53, n. 8, p. 1055-1057, 1975.
- BEASLEY, DEANNA, E.; BONISOLI-ALQUATI, A.; MOUSSEAU, T. A. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. **Ecological Indicators**, v. 30, p. 218-226, 2013.
- BLYSTONE, C. R.; LAMBRIGHT, C. S.; FURR, J.; WILSON, V. S.; GRAY, L. E. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. **Toxicology letters**, v. 174, n. 1, p. 74-81, 2007.
- BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=515>>. Acessado em: 04 de set. de 2016.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jun. 1989. Seção 1, p. 11459. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acessado em: 05 de set. de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada: protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agrotoxicos.pdf>. Acessado em: 13 de nov. de 2017.

BRASIL. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Ratificar os termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, de 9 de dezembro de 1991”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 dez. 1991. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html>. Acessado em: 05 de set. de 2016.

BRIDGES C. M.; SEMLITSCH R. D. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns amphibian decline. **Conservation Biology**, v. 14, n. 5, p. 1490-1499, 2000.

CANADIAN CENTRE FOR OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY. **What is a LD₅₀ and LC₅₀?**. 28 de ago. de 2013. Disponível em: <<http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>>. Acessado em: 10 de dez. de 2017.

COELHO, H. E. **Patologia veterinária**. 1. ed. Brasil: Editora Manole Ltda, 234p, 2002.

CRAMP, S; CONDER, P. J. The fifth report of the Joint Committee of the British Trust for Ornithology and the Royal Society for the Protection of Birds on Toxic Chemicals. Agosto 1963 - julho 1964. **Royal Society for the Protection of Birds**, Sandy, 1965.

DATTA, S. Effects of some pesticides on the embryonic stages of chick. **Journal of Environmental Research And Development**, v. 2, n. 3, 2008.

DEOTARE, S. T.; CHAKRABARTI, C. H. Effect of acephate (orthene) on tissue levels of thiamine, pyruvic acid, lactic acid, glycogen and blood sugar. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 259-264, 1981.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161-172, 1994.

DONNA, A.; BETTA, P. G.; ROBUTTI, F.; CROSIGNANI, P.; BERRINO, F.; BELLINGERI, D. Ovarian mesothelial tumors and herbicides: a case-control study. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 7, p. 941-942, 1984.

DUNACHIE, J. F.; FLETCHER, W. W. Em investigation of the toxicity of insecticides to birds' eggs using the egg-injection technique. **Annals of Applied Biology**, v. 64, n. 3, p. 409-423, 1969.

ÉBOLI, E. **Vítimas de pulverização de agrotóxico em escola rural de Goiás ainda sofrem com intoxicação**. 2013. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/brasil/vitimas-de-pulverizacao-de-agrotoxico-em-escola-rural-de-goias-ainda-sofrem-com-intoxicacao-10597709>>. Acessado em: 07 de dez. de 2017.

EDWARDS, C. A. The impact pesticides on the environment. In: OSTEEEN, C.; PIMENTEL, D.; LEHMAN, H. (Ed.). **The pesticide question: environment, economics and ethics**. New York: Chapman and Hall, p. 13-46, 1993.

EUROPEAN COMMISSION – HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Review report for the active substance iprodione**. 3 de dez. de 2002. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=69>>. Acessado em: 17 de set. de 2017.

EVANS, M. R.; THOMAS, A. L. R. The aerodynamic and mechanical effects of elongated tails in the scarlet-tufted malachite sunbird: measuring the cost of a handicap. **Animal Behaviour**, v. 43, n. 2, p. 337-347, 1992.

FALK, J. W.; CARVALHO, L. A.; SILVA, L. R.; PINHEIRO, S.; FRAGA JR., J. A.; WORM, P. V. Suicídio e doença mental em Venâncio Aires-RS: consequência do uso de Agrotóxicos Organofosforados. In: Salão de Iniciação Científica, 8, 1996, UFRGS, Porto Alegre. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1996.

FAO. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. Iprodione. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 30 p., 2006.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 391-400, 1999.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Pesticides and respiratory symptoms among farmers. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 6, p. 973-981, 2005.

FEHLBERG, L. C.C.; LUTZ, L. V.; MOREIRA, A. H. Agrotóxicos e seus efeitos sócio-culturais: Zona Rural do Vale do São Lourenço, Santa Teresa, ES, Brasil. **Natureza on line**, v. 1, n. 2, p. 51-55, 2003.

FLOATE, K. D.; FOX, A. S. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. **Ecological Applications**, v. 10, n. 5, p. 1541-1550, 2000.

FMC AGRÍCOLA. **Rovral SC – Relatório do produto**. N° 02208591, 2014. Disponível em: <https://www.fmcagricola.com.br/bula_geraPDF.aspx?cod=10>. Acessado em: 30 de out. de 2016.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Empresa que causou acidente ambiental deixará de produzir agrotóxicos**. 2012. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/1115285-empresa-que-causou-acidente-ambiental-deixara-de-produzir-agrotoxicos.shtml>>. Acessado em: 07 de dez. de 2017.

G1. **Aluno grava sobrevoos de avião em escola atingida por veneno, em GO**. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/goias/noticia/2013/05/aluno-grava-sobrevoos-de-aviao-em-escola-atingida-por-veneno-em-go.html>>. Acessado em: 07 de dez. de 2017.

G1. **Empresa é multada em R\$ 33 milhões por vazamento no Rio Paraíba**. 2008. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Rio/0,,MUL875594-5606,00-EMPRESA+E+MULTADA+EM+R+MILHOES+POR+VAZAMENTO+NO+RIO+PARAIBA.html>>. Acessado em: 07 de dez. de 2017.

GANGESTAD, S. W.; THORNHILL, R.; YEO, R. A. Facial attractiveness, developmental stability, and fluctuating asymmetry. **Ethology and Sociobiology**, v. 15, n. 2, p. 73-85, 1994.

GEORGOPOULOS, S. G.; SARRIS, M.; ZIOGAS, B. N. Mitotic instability in *Aspergillus nidulans* caused by the fungicides iprodione, procymidone and vinclozolin. **Pest Management Science**, v. 10, n. 5, p. 389-392, 1979.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Developmental biology**. 11. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 810 p., 2016.

GRAY, L. E.; OSTBY, J. S.; KELCE, W. R. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 46-52, 1994.

GREULICH, K.; HOQUE, E.; PFLUGMACHER, S. Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 52, n. 3, p. 256-266, 2002.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução**. 1. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 392 p., 2005.

GRUE, C. E.; SHIPLEY, B. K. Sensitivity of nestling and adult starlings to dicofol, an organophosphate pesticide. **Environmental research**, v. 35, n. 2, p. 454-465, 1984.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 6, p. 632-637, nov./dez., 2008.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HARDERSEN, S.; WRATTEN, S. D. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *Xathocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry. **Ecotoxicology**, v. 7, n. 5, p. 297-304, 1998.

HAYES, T. B.; STUART, A. A.; MENDOZA, M.; COLLINS, A.; NORIEGA, N.; VONK, A.; JOHNSTON, G.; LIU, R.; KPODZO, D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. Suppl 1, p. 134, 2006.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

HOFFMAN, D. J.; EASTIN, W. C. Effects of malathion, diazinon, and parathion on mallard embryo development and cholinesterase activity. **Environmental research**, v. 26, n. 2, p. 472-485, 1981.

HUNT, E. G.; KEITH, J. O. **Pesticide-wildlife investigations in California-1962**. Department of Fish and Game, 1962.

HUSSEIN, M.; SINGH, V.; HASSAN, M.; SINGH, A.; YADAV, B. Malformations and teratogenic effects of imidacloprid on chick embryo. **Scholars Journal of Applied Medical Sciences**, v. 2, p. 67-72, 2014.

IBAMA. **Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins – Sistema de Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental**. 2009. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola/ppa#sistemadeclassificacao>>. Acessado em: 04 de set. de 2016.

JAGA, K. What are the implications of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body?. **Medical hypotheses**, v. 54, n. 1, p. 18-25, 2000.

JAYAWARDENA, U. A.; RAJAKARUNA, R. S.; NAVARATNE, A. N.; AMERASINGHE, P. H. Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, n. 5, p. 641-648, 2010.

- JOSHI, N.; RHOADES, M. G.; BENNETT, G. D.; WELLS, S. M.; MIRVISH, S. S.; BREITBACH, M. J.; SHEA, P. J. Developmental abnormalities in chicken embryos exposed to N-nitrosoatrazine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 76, n. 17, p. 1015-1022, 2013.
- KALENDER, Y.; KALENDER, S.; UZUNHISARCIKLI, M.; OGUTCU, A.; AÇIKGOZ, F.; DURAK, D. Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. **Toxicology**, v. 200, n. 2, p. 205-211, 2004.
- KEIFER, M. C.; FIRESTONE, J. Neurotoxicity of pesticides. **Journal of agromedicine**, v. 12, n. 1, p. 17-25, 2007.
- KEITH, J. A. Reproduction in a population of herring gulls (*Larus argentatus*) contaminated by DDT. **Journal of Applied Ecology**, p. 57-70, 1966.
- KIPARISSIS, Y.; METCALFE, T. L.; BALCH, G. C.; METCALFE, C. D. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 391-403, 2003.
- KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n. 2, p. 435-45, mar./apr. 2002.
- KORHONEN, A.; HEMMINKI, K.; VAINIO, H. Application of the chicken embryo in testing for embryotoxicity: thiurams. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 63-69, 1982.
- KOUNDINYA, P. R.; RAMAMURTHI, R. Effect of organophosphate pesticide Sumithion (Fenitrothion) on some aspects of carbohydrate metabolism in a freshwater fish, *Sarotherodon* (*Tilapia*) *mossambicus* (Peters). **Experientia**, v. 35, n. 12, p. 1632-1633, 1979.
- KRÜGER, M.; SCHRÖDL, W.; PEDERSEN, I.; SHEHATA, A. A. Detection of glyphosate in malformed piglets. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 4, n. 230, p. 2161-0525.1000230, 2014.
- LAJMANOVICH, R. C.; SANDOVAL, M. T.; PELTZER, P. M. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 0612-0618, 2003.
- LALEY, B. O.; GIBSON, M. A. Association of hypoglycemia and pancreatic islet tissue with micromelia in Malathion-treated chick embryos. **Canadian journal of zoology**, v. 55, n. 2, p. 261-264, 1977.
- LEMOS, M. F. L.; VAN GESTEL, C. A. M.; SOARES, A. M. V. M. Endocrine disruption in a terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin. **Journal of soils and sediments**, v. 9, n. 5, p. 492-500, 2009.
- LEMOS, M. F. L.; VAN GESTEL, C. A. M.; SOARES, A. M. V. M. Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 907-913, 2010.

LIOI, M. B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M. V. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 403, n. 1, p. 13-20, 1998.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 188 pp, 2011.

MACINNIS-NG, C. M. O.; RALPH, P. J. Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. **Aquatic Botany**, v. 76, n. 1, p. 1-15, 2003.

MCKERNAN, M. A.; RATTNER, B. A.; HALE, R. C.; OTTINGER, M. A. Egg incubation position affects toxicity of air cell administered polychlorinated biphenyl 126 (3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl) in chicken (*Gallus gallus*) embryos. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2724-2727, 2007.

MARQUES, M. B.; BORTOLETTO, M. E.; FREITAS, C. M.; BEZERRA, M. C.; SANTANA, R. A. L. Intoxicações e envenenamentos acidentais no Brasil: análise epidemiológica dos casos registrados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX. Informe Epidemiológico do SUS. **CENEPI/FNS/MS**. Brasília, v. 2, n. 4, p. 59-93, 1993.

MARTYNIUK, C. J.; ALVAREZ, S.; LO, B. P.; ELPHICK, J. R.; MARLATT, V. L. Hepatic protein expression networks associated with masculinization in the female fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Journal of proteome research**, v. 11, n. 8, p. 4147-4161, 2012.

MATHUR, P.; TAPARIA, N.; NITU, K.; SHAHANI, L. Insecticide Marshal® EC induces teratological changes in the embryos of *Gallus domesticus*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 267, 2013.

MEINIEL, R. Agents anticholinestérasiques et tératogénèse axiale chez l'embryon de Caille. **Development Genes and Evolution**, v. 185, n. 3, p. 209-225, 1978.

MEINIEL, R. Embryologie expérimentale activités cholinestérasiques et expression de la tératogénèse axiale chez l'embryon de Caille exposé aux organophosphores. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. Paris, 285, p. 401-404, 1977.

MELLO, I. C. M. F. de. **Resiliência da comunidade de macroinvertebrados aquáticos após a aplicação dos agrotóxicos nas lavouras de arroz irrigado no Sul do Brasil**. 2013. 70 p. Tese (Mestrado em Diversidade e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo.

MENQ, W. **Biomagnificação nas aves de rapina. Uso de agrotóxicos, pesticidas e afins, podem causar vários efeitos negativos na população de rapinantes**. Aves de rapina Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.avesderapinabrasil.com/materias/envenenamento_avesderapina.htm>. Acessado em: 3 de out. de 2016.

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Fiscalização**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos/fiscalizacao>>. Acessado em: 05 de set. de 2016.

MIRANDA, A. C.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n.1, p.7-14, jan./mar. 2007.

MOBARAK, Y. M.; AL-ASMARI, M. A. Endosulfan impacts on the developing chick embryos: morphological, morphometric and skeletal changes. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, n. 2, p. 107, 2011.

MØLLER, A. P. Patterns of fluctuating asymmetry in weapons: evidence for reliable signalling of quality in beetle horns and bird spurs. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 248, n. 1322, p. 199-206, 1992.

MØLLER, A. P. Sexual selection in the barn swallow (*Hirundo rustica*). IV. Patterns of fluctuating asymmetry and selection against asymmetry. **Evolution**, p. 658-670, 1994.

MØLLER, A. P.; POMIANKOWSKI, A. Fluctuating asymmetry and sexual selection. **Genetica**, v. 89, n. 1-3, p. 267, 1993.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 348p., 2012.

MOORE, N. W.; TATTON, J. G. Organochlorine insecticide residues in the eggs of sea birds. **Nature**, v. 207, n. 4992, p. 42-43, 1965.

MOORE, N. W.; WALKER, C. H. Organic chlorine insecticide residues in wild birds. **Nature**, v. 201, p. 1072-1073, 1964.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J. de.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. de O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

NHGRI/NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **Researchers Compare Chicken, Human Genomes: Analysis of First Avian Genome Uncovers Differences Between Birds and Mammals**. ScienceDaily, 08 de dez. de 2004. Disponível em: <<https://www.genome.gov/12514316/2004-release-researchers-compare-chicken-human-genomes/2004-release-researchers-compare-chicken-human-genomes/>>. Acessado em: 10 de out. de 2016.

OLIVIERI, C. E.; COOPER, K. R. Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in embryos and larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Chemosphere**, v. 34, n. 5-7, p. 1139-1150, 1997.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Joint Press Release ILO/WHO Number of Work related Accidents and Illnesses Continues to Increase ILO and WHO Join in Call for Prevention Strategies**. Geneva, 28 de abr. de 2005. Disponível em: <http://www.ilo.org/global/about-the-ilo/newsroom/news/WCMS_005161/lang--en/index.htm>. Acessado em: 27 de set. de 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Public health impact of pesticides used in agriculture. **Geneva: World Health Organization**, 128 p., 1990.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: **Organização Pan-americana da Saúde/OMS**, 69 p., 1996.

ORTON, F.; LUTZ, I.; KLOAS, W.; ROUTLEDGE, E. J. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 6, p. 2144-2150, 2009.

PACHECO, A. de O.; HACKEL, C. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, 2002.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586-1595, 2010.

PAMANJI, R.; BETHU, M. S.; YASHWANTH, B.; LEELAVATHI, S.; RAO, J. V. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7744-7753, 2015.

PANAHI, P.; VOSOUGH-GHANBARI, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; OSTAD, S. N.; NIKFAR, S.; MINAIE, B.; ABDOLLAHI, M. Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 16, n. 4, p. 161-167, 2006.

PAPPAS, A. C.; FISHER, D. J. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. **Pesticide Management Science**, v. 10, n. 3, p. 239-246, 1979.

PARANÁ: NORTOX S/A. **Glifosato 480 BR**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nº 014007, 2015. Disponível em: <<http://www.nortox.com.br/produto/herbicidas/glifosato-480-br>>. Acessado em: 18 de set. de 2016.

PARANÁ: NORTOX S/A. **Glifosato 480 BR**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nº 05712, 2015. Disponível em:

<<http://www.nortox.com.br/produto/herbicidas/glifosato-nortox-480-sl>>. Acessado em: 18 de set. de 2016.

PARKER, M. L.; GOLDSTEIN, M. I. Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European Starling (*Sturnus vulgaris*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 233-242, 2000.

PARSHLEY, T. Report of an Alleged Adverse Effect from Atrazine: Atrazine technical. **EPA. Reg.** n. 100-529, 2000.

PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **Science of the total environment**, Netherlands, v.188, n. 1, p. 86-98, set. 1996.

PIMENTEL, D.; ACQUAY, H.; BILTONEN, M.; RICE, P.; SILVA, M.; NELSON, J.; LIPNER, V.; GIORDANO, S.; HOROWITZ, A.; D'AMORE, M. Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In: OSTEEN, C.; PIMENTEL, D.; LEHMAN, H. (Ed.). **The pesticide question: environment, economics and ethics**. New York: Chapman and Hall, p. 47-84, 1993.

POTTI, A.; GANTI, A. K.; SHOLES, K.; LANGNESS, E.; KOKA, V.; HORVARTH, L.; KOCH, M. Effect of pesticide exposure on *HER-2/neu* overexpression seen in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. **Clinical cancer research**, v. 9, n. 13, p. 4872-4876, 2003.

RADICE, S.; FERRARIS, M.; MARABINI, L.; GRANDE, S.; CHIESARA, E. Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 51-58, 2001.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 88, n. 2, p. 115-121, 2007.

RAMOS, A.; SILVA FILHO, J. F. da. Exposição a pesticidas, atividade laborativa e agravos à saúde. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.14, n. 1, p. 140, 2004.

REBELO, R. M.; VASCONCELOS, R. A.; BUYS, B. D. M. C.; REZENDE, J. A.; MORAES, K. O. C.; OLIVEIRA, R. P. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. 2. ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 84 p., 2010.

REENA, K.; AJAY, K.; SHARMA, C. B. Haematological changes induced by dimethoate in rat. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 40, n. 1, p. 23, 1989.

REZG, R.; MORNAGUI, B.; EL-ARBI, M.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. Effect of subchronic exposure to malathion on glycogen phosphorylase and hexokinase activities in rat liver using native PAGE. **Toxicology**, v. 223, n. 1, p. 9-14, 2006.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e a saúde e a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, 2009.

ROBENS, J. F. Teratologic studies of carbaryl, diazinon, norela, disulfiram, and thiram in small laboratory animals. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 152-163, 1969.

ROBINSON, J.; RICHARDSON, A.; CRABTREE, A. N.; COULSON, J. C.; POTTS, G. R. Organochlorine residues in marine organisms. **Nature**, v. 214, n. 5095, p. 1307-1311, 1967.

SAHU, C. R.; GHATAK, S. Effects of dimecron on developing chick embryo: malformations and other histopathological changes. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 31, n. 1, p. 15-20, 2002.

SASTRY, K. V.; SIDDIQUI, A. A. Chronic toxic effects of the carbamate pesticide sevin on carbohydrate metabolism in a freshwater snakehead fish, *Channa punctatus*. **Toxicology letters**, v. 14, n. 1-2, p. 123-130, 1982.

SCHUYTEMA, G. S.; NEBEKER, A. V. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of Pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 370-376, 1998.

SEIFERT, J. Teratogenesis of polychlorocycloalkane insecticides in chicken embryos resulting from their interactions at the convulsant recognition sites of the GABA (pro) receptor complex. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 42, n. 5, p. 707-715, 1989.

SHELTON, J. F.; GERAGHTY, E. M.; TANCREDI, D. J.; DELWICHE, L. D.; SCHMIDT, R. J.; RITZ, B.; HANSEN, R. L.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 10, p. 1103, 2014.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil Rural work and risk factors associated with pesticide use in Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1117-1127, 2003.

SOUZA, D. A. de. **Efeitos da exposição pré e pós-natal de MALATHION sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista**. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão.

STOPPELLI, I. M. de B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. Sup, 2005.

TAVERA-MENDOZA, L.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; C. Y. R., D.; MARCOGLIESE, D. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 527-531, 2002.

THE BHOPAL MEDICAL APPEAL. **Union Carbide's Disaster**. 2014. Disponível em: <<http://bhopal.org/what-happened/union-carbides-disaster/>>. Acessado em: 18 de set. de 2016.

TILLMANN, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; DUFT, M.; MARKERT, B.; OEHLMANN, J. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 6, p. 373-388, 2001.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 101, n. 712, p. 483-514, 1927.

TÚLIO, S. **MPF pede indenização a vítimas após avião agrícola intoxicar 92 em escola**. Globo, Goiás, 29 de abr. de 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/goias/noticia/2016/04/mpf-pede-indenizacao-vitimas-apos-aviao-agricola-intoxicar-92-em-escola.html>>. Acessado em: 07 de dez. de 2017.

VALDES, S. A. C. **Estudo da contaminação por agrotóxicos em aves da Família Caprimulgidae no Parque Nacional das Emas (GO)**. 2007. 109 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, p. 1-155, 1992.

WEBSTER, T. M. U.; LAING, L. V.; FLORANCE, H.; SANTOS, E. M. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental science & technology**, v. 48, n. 2, p. 1271-1279, 2014.

WEBSTER, T. M. U.; PERRY, M. H.; SANTOS, E. M. The herbicide linuron inhibits cholesterol biosynthesis and induces cellular stress responses in brown trout. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 5, p. 3110-3118, 2015.

WYTTEBACH, C. R.; THOMPSON, S. C. The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: malformations detected by histological examination. **Developmental Dynamics**, v. 174, n. 2, p. 187-202, 1985.

WORRALL, J. J. Structure and dynamics of fungal populations. **Springer Science & Business Media**, v. 25, 348 p., 1999.

ANEXOS

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA

CENTRO
UNIVERSITÁRIO**CEUA**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS

Prezado (a) Senhor (a)

Confirmamos, para os devidos fins, que o projeto de pesquisa intitulado: Efeitos do fungicida Iprodiona (Rovral®) sobre o desenvolvimento de embriões de aves sob responsabilidade da professora Carla Vermeulen Carvalho Grade, possui número de registro - **1607**, protocolado em **15/04/2016** em nossa Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Centro Universitário – FAG.

Colocamo-nos a disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente

Andressa Almeida

Secretária do CEUA/FAG

ANEXO B – TABELAS

Tabela 1 – Concentração de 1,5 µL/mL.

1,5 µL/mL			
Incubar - 21/09/2016		Coleta - 28/09/2016	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	55,10	0,7000*	Vivo
2 _T	58,20		Nada
3 _C	49,50	0,4000*	Vivo
4 _T	55,10	0,4000*	Vivo
5 _C	57,00		Nada
6 _T	55,10	Sem peso*	Vivo
7 _C	63,10	0,4000*	Vivo
8 _T	49,70	Sem peso*	Vivo
9 _C	59,30	0,4000*	Vivo
10 _T	60,10	Sem peso*	Vivo
11 _C	54,50	0,4000*	Vivo
12 _T	53,30	Sem peso*	Vivo

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado;

* – Balança com defeito.

Tabela 2 – Concentração de 3 µL/mL.

3 µL/mL			
Incubar - 18/10/2016		Coleta - 25/10/2016	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	59,70	0,8947	Vivo
2 _T	58,00	0,8394	Vivo
3 _C	50,00	0,8870	Vivo
4 _T	58,00		Morto
5 _C	56,00	0,9452	Vivo
6 _T	60,00		Nada
7 _C	54,00	0,9743	Vivo
8 _T	57,00	1,0345	Vivo
9 _C	53,00	0,9491	Vivo
10 _T	60,00	0,9194	Vivo
11 _C	60,00	1,0498	Vivo
12 _T	53,00	1,0777	Vivo

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 3 – Concentração de 6 µL/mL, 12 µL/mL e 24 µL/mL.

6 µL/mL			
Incubar - 23/11/2016		Coleta - 30/11/2016	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	49,47		Morto
2 _C	54,52	0,9727	Vivo
3 _C	58,53		Morto
4 _C	51,62	0,8882	Vivo
5 _C	62,09	1,0806	Vivo
6 _C	57,97	1,0425	Vivo
7 _T	65,80	1,0094	Vivo
8 _T	63,50	0,8915	Vivo
9 _T	64,31	1,1075	Vivo
10 _T	64,30	0,9346	Vivo
11 _T	63,34	1,0549	Vivo
12 _T	54,50	1,0867	Vivo
12 µL/mL			
13 _T	58,09	*	Vivo
14 _T	58,94	*	Vivo
15 _T	63,68	*	Vivo
16 _T	69,53	*	Vivo
17 _T	63,21	*	Vivo
18 _T	58,09		
24 µL/mL			
19 _T	55,97	*	Vivo
20 _T	62,14	*	Vivo
21 _T	56,01	*	Vivo
22 _T	54,72	*	Vivo
23 _T	57,63		
24 _T	57,05		

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado;

* - Sem peso.

Tabela 4 – Concentração de 48 µL/mL e 96 µL/mL.

(continua)

48 µL/mL			
Incubar - 22/03/2017		Coleta - 29/03/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	60,30		Não galado
2 _C	64,60		Não galado
3 _T	60,60	0,4739	Vivo
4 _T	63,60	0,1458	Vivo, pequeno, olho malformado, intensas malformações no corpo
5 _T	56,80		Não galado

Tabela 4 – Concentração de 48 µL/mL e 96 µL/mL.

(conclusão)

48 µL/mL			
Incubar - 22/03/2017		Coleta - 29/03/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
6 _T	52,10	0,6078	Não galado
7 _T	57,00		Vivo
96 µL/mL			
8 _T	68,00	0,8817	Vivo
9 _T	47,80	0,7600	Não galado
10 _T	62,40		Vivo
11 _T	57,70	0,5588	Morto, intensas malformações cardíacas, com muita hemorragia, pernas malformadas
12 _T	58,60	0,3607	Morto, malformado

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 5 – Concentração de 96 µL/mL.

96 µL/mL			
Incubar 19/04/2017		Coleta 26/04/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	60,60	0,6000	Vivo
2 _C	62,40	0,6500	Vivo
3 _T	60,30	0,3800	Vivo
4 _T	60,40	0,4000	Morto, com sangue
5 _T	58,30		Morto, com sangue
6 _T	56,00		Não galado
7 _T	61,90		Morto, malformado, com hemorragia
8 _T	60,40		Não galado
9 _T	53,70	0,7500	Não galado
10 _T	52,60		Morto, com hemorragia, cauda encurtada, membros malformados
11 _T	63,30		Vivo, pequeno, microftalmia
12 _T	60,00	0,7100	Vivo

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 6 – Concentração de 96 µL/mL.

96 µL/mL			
Incubar 17/05/2017		Coleta 24/05/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	50,30		Vivo
2 _C	46,90		Vivo
3 _T	51,60		Morto, grande, hemorragia lado esquerdo do coração
4 _T	51,80		Nada
5 _T	46,70	0,5900	Vivo, com malformações
6 _T	43,00	0,6100	Vivo
7 _T	45,70		Nada
8 _T	50,40	0,7700	Vivo
9 _T	48,70	Sem peso	Morto
10 _T	54,20	0,1200	Morto
11 _T	60,90	0,7400	Vivo
12 _T	50,40	0,8600	Vivo
13 _T	43,40	0,7100	Vivo
14 _T	47,50	0,5400	Vivo
15 _T	51,40	0,5400	Vivo
16 _T	45,20	0,2300	Morto, malformado
17 _T	43,00	0,1900	Morto, malformado
18 _T	53,90	0,6900	Vivo
19 _T	45,70	0,2800	Vivo, microftalmia
20 _T	54,00		Nada
21 _T	51,40	0,3800	Morto, com hemorragia no coração e malformações
22 _T	43,90		Nada
23 _T	45,10		Morto, com sangue
24 _T	42,90		Nada

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 7 – Concentração de 192 µL/mL.

(continua)

192 µL/mL			
Incubar 31/05/2017		Coleta 07/06/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _T	66,95		Nada
2 _T	62,91		Nada
3 _T	69,66		Morto, com sangue
4 _T	65,99		Nada
5 _T	58,83		Nada
6 _T	69,41	0,6100	Vivo
7 _T	57,15	0,3200	Vivo

Tabela 7 – Concentração de 192 µL/mL.

(continuação)

192 µL/mL			
Incubar 31/05/2017		Coleta 07/06/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
8 _T	65,14		Nada
9 _T	68,91		Nada
10 _T	64,60		Nada
11 _T	61,23	0,5700	Vivo
12 _T	65,03		Nada
13 _T	62,94		Nada
14 _T	72,20		Nada
15 _T	64,22		Nada
16 _T	66,72		Nada
17 _T	68,40		Nada
18 _T	64,28		Nada
19 _T	57,91	0,3000	Vivo, pequeno
20 _T	62,79		Morto, com sangue
21 _T	68,11		Morto, com sangue
22 _T	56,38		Morto, com sangue
23 _T	55,23		Nada
24 _T	68,16		Nada
25 _T	67,09		Nada
26 _T	70,58	0,5200	Vivo
27 _T	72,44		Morto, com sangue
28 _T	62,50	0,0600	Morto, pequeno, não desenvolveu
29 _T	67,45		Nada
30 _T	62,28	0,9000	Vivo
31 _T	59,68		Nada
32 _T	65,52	0,5200	Vivo
33 _T	63,76		Morto
34 _T	67,88	Sem peso	Morto, não desenvolveu
35 _T	73,14		Nada
36 _T	62,29		Nada
37 _C	65,91	0,5700	Vivo
38 _C	60,26	0,6600	Vivo
39 _C	64,17	0,5000	Vivo
40 _C	64,77		Nada
41 _C	63,39	0,5900	Vivo
42 _C	67,87	0,5000	Vivo
43 _C	60,72	Sem peso	Morto
44 _C	65,83	0,4200	Vivo
45 _C	57,04	0,4800	Morto, malformado

Tabela 7 – Concentração de 192 µL/mL.

(conclusão)

192 µL/mL			
Incubar 31/05/2017		Coleta 07/06/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
46 _C	70,66	Sem peso	Morto
47 _C	60,08	0,4600	Vivo
48 _C	62,93	0,5500	Vivo
49 _C	55,24	0,6700	Vivo
50 _C	59,51	0,6800	Vivo
51 _C	62,64	0,3700	Vivo, pequeno
52 _C	64,29	0,3700	Vivo
53 _C	62,24	0,6300	Vivo
54 _C	67,32		Nada
55 _C	71,93	0,4900	Vivo, olho não desenvolveu
56 _C	66,94	0,6600	Vivo
57 _C	65,07		Nada
58 _C	70,77	0,6900	Vivo
59 _C	54,52	0,7100	Vivo
60 _C	67,07		Morto, com sangue

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 8 – Concentração de 120 µL/mL.

(continua)

120 µL/mL			
Incubar 14/06/2017		Coleta 21/06/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	60,31	0,3800	Vivo
2 _C	62,72	0,2300	Vivo, malformado, microftalmia, encéfalo amassado
3 _T	53,70		Nada
4 _T	59,34	0,3400	Vivo
5 _T	64,57	0,5200	Vivo
6 _T	63,31		Nada
7 _C	59,23		Nada
8 _T	57,02		Nada
9 _T	57,87		Nada
10 _T	57,94		Nada
11 _T	65,35		Nada
12 _T	63,35		Nada
13 _T	59,45		Morto, com sangue
14 _T	61,31		Nada
15 _T	65,45		Nada

Tabela 8 – Concentração de 120 µL/mL.

(conclusão)

120 µL/mL			
Incubar 14/06/2017		Coleta 21/06/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
16 _T	64,54		Nada
17 _T	67,80		Nada
18 _T	64,53		Nada
19 _T	61,40		Nada
20 _T	61,94	0,2400	Vivo
21 _T	57,16		Nada
22 _T	57,35	Sem peso	Morto
23 _T	57,45		Nada
24 _T	60,17	0,5300	Vivo

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 9 – Concentração de 100 µL/mL.

(continua)

100 µL/mL			
Incubar 28/06/2017		Coleta 05/07/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _N	75,32		Nada
2 _N	77,67	0,3100	Vivo
3 _N	75,29		Nada
4 _N	63,08		Nada
5 _N	72,04		Nada
6 _N	68,71	0,5100	Vivo
7 _N	63,52		Morto, com sangue
8 _N	64,99		Morto, com sangue
9 _N	67,59	0,6400	Vivo
10 _N	71,77	0,2500	Vivo
11 _N	72,99		Morto, com sangue
12 _N	68,70	0,3400	Vivo
13 _C	74,90	0,5200	Vivo
14 _C	61,03		Nada
15 _C	55,16	0,1400	Morto
16 _C	53,22	0,2900	Vivo
17 _C	66,02	0,4400	Vivo
18 _C	61,18	0,1600	Morto
19 _C	67,76		Nada
20 _C	72,90		Nada

Tabela 9 – Concentração de 100 µL/mL.

(conclusão)

100 µL/mL			
Incubar 28/06/2017		Coleta 05/07/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
21 _C	70,55	0,6600	Vivo
22 _C	45,71	0,4600	Vivo
23 _C	68,38		Nada
24 _C	66,87	0,5100	Vivo
25 _T	68,51		Nada
26 _T	71,62		Nada
27 _T	66,62		Morto, com sangue
28 _T	72,81		Nada
29 _T	67,27	0,0600	Morto, pequeno
30 _T	72,24		Nada
31 _T	69,88		Nada
32 _T	68,43		Nada
33 _T	68,74		Nada
34 _T	70,42	0,0500	Morto, embrião pequeno
35 _T	63,24		Nada
36 _T	60,49		Morto, com sangue

N – Grupo normal;

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 10 – Concentração de 100 µL/mL.

(continua)

100 µL/mL			
Incubar 18/08/2017		Coleta 25/08/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _T	53,50	0,7400	Vivo
2 _T	42,30		Nada
3 _T	42,30	0,6400	Vivo, com estrutura anormal no coração
4 _T	47,20	0,2800	Vivo
5 _T	41,60		Nada
6 _T	47,30	Sem peso	Morto
7 _T	45,90	0,1100	Morto, com hemorragia no lado esquerdo
8 _T	52,90	0,6700	Vivo
9 _T	49,30	0,5400	Vivo
10 _T	49,50	0,3400	Vivo
11 _T	40,30		Nada
12 _T	Sem ovo	Sem ovo	Sem ovo

Tabela 10 – Concentração de 100 µL/mL.

(conclusão)

100 µL/mL			
Incubar 18/08/2017		Coleta 25/08/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
13 _T	50,80		Morto
14 _T	45,70		Morto
15 _T	46,30	0,7400	Vivo, com hemorragia, corpo com estrias vermelhas
16 _T	44,80	0,7000	Vivo
17 _T	46,80		Nada
18 _T	47,70		Nada
19 _C	45,60	0,4500	Vivo
20 _C	45,90		Nada
21 _C	43,50		Morto, com sangue
22 _C	43,00	0,6600	Vivo
23 _C	48,70	0,7200	Vivo, com estrutura anormal no coração
24 _C	49,30	Sem peso	Morto

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 11 – Concentração de 100 µL/mL.

(continua)

100 µL/mL			
Incubar 28/08/2017		Coleta 04/09/2017 - com Carnoy	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	63,50	0,7535	Vivo
2 _C	55,60		Morto, com sangue
3 _C	51,90	0,9247	Vivo
4 _C	67,30		Nada
5 _C	54,70		Nada
6 _C	53,00	0,6255	Vivo
7 _C	55,20	0,7461	Vivo
8 _C	66,90		Nada
9 _C	61,40	0,8704	Vivo
10 _C	69,20	Sem peso	Morto, embrião pequeno
11 _C	63,10		Nada
12 _C	73,00		Nada
13 _T	58,30		Morto
14 _T	66,30		Morto, com sangue
15 _T	58,80		Morto, com sangue
16 _T	58,10		Nada
17 _T	51,80	0,2920	Vivo
18 _T	57,40		Morto, com sangue

Tabela 11 – Concentração de 100 µL/mL.

(conclusão)

100 µL/mL			
Incubar 28/08/2017		Coleta 04/09/2017 - com Carnoy	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
19 _T	43,90		Morto, com sangue
20 _T	57,00	0,1252	Vivo, pequeno, hemorragia no cérebro, microftalmia, membro inferior não desenvolveu
21 _T	52,00		Nada
22 _T	58,90	Sem peso	Morto, embrião pequeno, possíveis problemas cardíacos
23 _T	63,40		Nada
24 _T	65,90		Nada
25 _T	67,00		Morto, com sangue
26 _T	53,20	0,4732	Vivo
27 _T	50,70	0,6321	Vivo
28 _T	59,80	0,7141	Vivo
29 _T	67,00		Nada
30 _T	53,00		Nada
31 _T	62,00		Nada
32 _T	64,50	0,7857	Vivo
33 _T	61,10		Morto
34 _T	58,50		Nada
35 _T	49,50		Nada
36 _C	53,30		Morto, com sangue

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 12 – Concentração de 83,3 µL/mL.

(continua)

83,3 µL/mL			
Incubar 12/09/2017		Coleta 19/09/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	65,66	0,6931	Vivo
2 _C	53,76	0,6786	Vivo
3 _C	51,73	0,3540	Morto, hemorragia do lado esquerdo
4 _C	59,83		Nada
5 _C	53,34		Nada
6 _C	55,61	0,2025	Morto
7 _C	50,06	0,9526	Vivo
8 _C	56,42	0,7211	Vivo
9 _C	50,98		Nada
10 _C	59,00		Nada
11 _C	57,27	0,9271	Vivo
12 _C	64,42		Nada

Tabela 12 – Concentração de 83,3 µL/mL.

(conclusão)

83,3 µL/mL			
Incubar 12/09/2017		Coleta 19/09/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
13 _T	56,22		Nada
14 _T	55,18		Nada
15 _T	44,61	0,8266	Vivo
16 _T	42,50	0,7952	Vivo
17 _T	60,26		Nada
18 _T	58,90		Nada
19 _T	48,18		Morto, com sangue
20 _T	54,11		Nada
21 _T	58,21	0,7128	Vivo
22 _T	53,27		Nada
23 _T	51,33	0,7004	Vivo
24 _T	61,25		Nada

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 13 – Concentração de 83,3 µL/mL.

(continua)

83,3 µL/mL			
Incubar 25/09/2017		Coleta 02/10/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	60,20	0,5785	Vivo
2 _C	46,18	0,7171	Vivo
3 _C	52,13	0,8144	Vivo
4 _C	44,77	0,8532	Vivo
5 _C	57,40	0,8297	Vivo
6 _C	52,43	0,6795	Vivo
7 _C	48,43	0,4305	Vivo, com hemorragia no encéfalo, microftalmia
8 _C	49,05		Nada
9 _C	52,38	0,3351	Vivo
10 _C	43,86	0,7274	Vivo
11 _C	44,83	0,2471	Vivo
12 _C	44,85	Sem peso	Morto, embrião pequeno
13 _C	44,74	0,6283	Vivo
14 _C	52,57	0,7411	Vivo
15 _C	54,65	0,7717	Vivo
16 _N	48,64		Nada
17 _N	54,71	0,7294	Vivo
18 _N	53,20	0,5816	Vivo

Tabela 13 – Concentração de 83,3 µL/mL.

(conclusão)

83,3 µL/mL			
Incubar 25/09/2017		Coleta 02/10/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
19 _N	44,80	0,7708	Vivo
20 _N	44,89	0,6754	Vivo
21 _N	51,34		Nada
22 _T	49,14		Morto, com sangue
23 _T	49,31	0,6813	Vivo
24 _T	52,04		Morto, com sangue
25 _T	47,62	1,0092	Vivo, corpo retorcido
26 _T	40,40	0,6880	Vivo
27 _T	44,28	0,6644	Vivo
28 _T	54,94	0,6500	Vivo
29 _T	52,38		Nada
30 _T	48,82		Morto, com sangue
31 _T	53,65		Morto, com sangue
32 _T	51,79	0,5555	Vivo
33 _T	52,55		Morto, com sangue
34 _T	48,05	Sem peso	Morto, pequeno
35 _T	49,84	0,5192	Vivo
36 _T	61,60	0,5747	Vivo

N – Grupo normal;

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 14 – Concentração de 93,3 µL/mL.

(continua)

93,3 µL/mL			
Incubar 03/10/2017		Coleta 10/10/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
1 _C	49,18	0,0731	Morto, desenvolvimento interrompido
2 _C	53,10		Nada
3 _C	43,27	0,6394	Vivo
4 _C	51,20		Nada
5 _C	43,57	0,6843	Vivo
6 _C	44,48	0,8306	Vivo
7 _C	50,67	0,8099	Vivo
8 _C	53,10	0,7076	Vivo
9 _C	45,81	0,7173	Vivo
10 _C	47,94	0,6371	Vivo

Tabela 14 – Concentração de 93,3 µL/mL.

(conclusão)

93,3 µL/mL			
Incubar 03/10/2017		Coleta 10/10/2017	
Ovo	Peso do ovo (g)	Peso do embrião (g)	Observações
11 _C	54,89	0,5753	Vivo
12 _C	52,06	0,2406	Morto, com hemorragia no encéfalo irradiada para o tronco
13 _C	52,76	0,7364	Vivo
14 _C	47,00	0,7014	Vivo
15 _C	49,89	0,6655	Vivo
16 _N	39,79		Nada
17 _N	39,77	0,5718	Vivo
18 _N	62,58	0,6527	Vivo
19 _N	48,50	1,1367	Vivo
20 _N	Quebrado	Quebrado	Quebrado
21 _N	49,84	0,8240	Vivo
22 _T	46,60	1,1081	Vivo
23 _T	55,16		Morto, pequeno
24 _T	50,12	0,7255	Vivo
25 _T	44,58	0,1468	Morto, pequeno, microftalmia
26 _T	50,45		Nada
27 _T	52,54	0,3590	Vivo, sem bico, encéfalo visivelmente diminuído
28 _T	47,38	0,6357	Vivo
29 _T	51,10		Morto, pequeno
30 _T	62,73	0,5205	Vivo
31 _T	40,58		Nada
32 _T	44,83	0,2059	Morto, com hemorragia encefálica
33 _T	56,31	0,7171	Vivo
34 _T	55,62		Nada
35 _T	51,76	0,3791	Morto, hemorragia lado direito do corpo
36 _T	51,45	0,7661	Vivo

N – Grupo normal;

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 15 – Medidas dos embriões controles, normais e tratados vivos na concentração de 83,3 µL/mL.

(continua)

	Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)					Estágio
	Embrião	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	
Controle	1	4,41	6,05	8,84	9,88	4,19	4,84	5,43	8,31	9,71	4,13	30
	2	4,27	5,85	8,32	8,58	2,11	3,24	5,52	8,62	8,45	3,13	30
	3	4,88	6,35	9,52	10,32	4,41	4,55	7,37	9,18	10,19	4,61	30
	4	5,55	7,44	10,02	10,41	4,65	5,67	7,43	9,1	10,3	4,77	31

Tabela 15 – Medidas dos embriões controles, normais e tratados vivos na concentração de 83,3 $\mu\text{L/mL}$.

(conclusão)

	Lado		Esquerdo (mm)				Direito (mm)					
	Embrião	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Estágio
Controle	5	5,16	7,63	10,07	10,07	4,69	5,12	7,79	9,85	10,2	4,68	31
	6	5,01	6,56	8,76	10,03	4,56	5,05	5,77	9,08	10,16	4,42	30
	7	4,54	6,26	9,16	9,57	4,48	4,79	6,2	8,96	9,76	4,38	30
	8	5,77	5,02	9,49	9,83	4,57	5,91	6,52	9,87	10,35	4,45	32
	9	5,45	5,89	9,02	9,72	4,04	5,04	7,18	9,79	10,05	4,64	30
	10	3,84	5,99	8,21	9,47	4,23	3,32	5,78	8,2	9,77	4,24	30
	11	2,9	3,53	6,37	6,98	2,37	2,65	Arrancado	6,24	6,93	2,53	28
	14	5,84	5,44	9,43	10,31	4,7	4,99	7,41	9,82	10,43	4,65	30
Tratados	1	4,71	6,75	8,78	9,81	4,59	4,99	6,09	8,94	9,82	4,26	30
	2	5,04	6,04	8,73	10,06	4,42	4,79	6,63	9,16	9,92	4,3	30
	3	4,53	6,02	8,18	9,37	4,35	4,3	5,87	8,57	9,3	4,15	30
	4	4,17	5,41	8,3	8,9	4,03	4,08	4,7	7,96	8,82	3,99	29
	5	4,62	5,53	9,24	9,6	4,44	5,01	6,29	8,67	9,71	4,5	30
	6	4,56	6,02	8,3	9,09	3,92	4,39	6,3	8,7	9,24	4,07	30
	7	6,38	9,93	10,73	10,53	4,92	5,93	10,17	10,62	10,28	4,92	32
	8	4,06	4,97	6,18	9,48	4,11	4,49	3,76	8,39	9,44	4,25	30

Tabela 16 – Medidas dos embriões controles, normais e tratados na concentração de 93,3 $\mu\text{L/mL}$.

	Lado		Esquerdo (mm)				Direito (mm)					
	Embrião	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Estágio
Controles	1	4,86	6,82	9,11	9,98	4,48	4,91	5,79	8,82	10,01	4,54	31
	2	4,59	6,22	8,69	9,75	4,38	4,53	6,12	8,94	9,88	4,14	31
	3	5,11	7,22	8,82	10,05	4,5	4,92	5,67	8,84	9,89	4,59	31
	4	4,36	5,44	8,37	9,56	4,44	4,32	6,99	8,73	9,99	4,47	30
	5	5,38	6,71	8,12	10,44	4,66	5,62	6,93	9,59	10,64	4,89	31
	6	5,49	7,67	9,34	10,7	4,53	5,28	6,56	9,28	10,85	4,64	31
	7	4,64	6,86	8,93	9,86	4,48	4,85	6,49	9,57	10,11	4,58	30
	8	4,49	6,03	7,86	9,34	4,18	4,26	5,38	8,22	9,59	4,06	30
	9	4,58	6,89	8,75	10,12	4,07	4,63	5,89	8,35	9,75	4,44	30
	10	4,84	6,95	8,37	9,78	4,55	5,02	6,7	8,89	9,88	4,67	30
	12	4,92	5,53	7,51	9,75	4,6	4,89	6,13	7,95	9,74	4,5	30
Tratados	2	3,37	4,44	8,31	7,49	3,38	3,8	4,09	7,98	7,78	3,29	28
	3	4,9	6,61	8,49	9,95	4,57	5,23	6,33	9,22	9,73	4,37	30
	7	4,95	7,19	9,09	10,03	4,38	4,7	5,32	8,99	10,04	4,45	30
	8	5,14	7,34	9,35	9,97	4,31	4,68	5,15	8,84	9,83	4,32	30
	9	5,12	7,25	8,87	10,24	4,35	5,17	5,92	9,21	10,72	4,52	30
	10	5,27	6,18	8,69	9,59	4,2	4,82	6,48	9,23	9,11	4,21	30
	12	7,32	11,23	10,59	10,94	4,64	6,92	11,27	10,07	11,21	4,32	32

Tabela 17 – Medidas dos embriões controles e tratados na concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$.

Lado		Esquerdo (mm)					Direito (mm)					Estágio
Embrião		Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	Membro superior	Membro inferior	Tronco	Cabeça	Olho	
Controles	1	4,41	5,72	7,61	8,73	4,56	4,37	5,98	7,76	8,96	4,19	30
	2	3,94	5,84	7,79	8,35	4,17	4,24	5,66	7,4	8,23	3,91	31
	3	4,7	7,02	8,58	9,21	4,71	4,72	6,46	8,34	9,3	4,31	31
	4	4,03	5,58	8,18	8,26	4,1	4,01	5,14	7,54	8,24	4,22	30
	5	3,35	4,18	6,32	7,03	3,78	3,39	5,02	6,61	7,05	3,91	30
Tratados	1	3,95	6,01	7,97	8,18	4,18	4,19	5,45	7,82	8,41	3,8	31
	2	4,22	5,28	7,34	8,46	4,32	3,77	5,18	7,57	8,15	4,18	31
	3	4,08	5,17	8,39	8,59	4,27	3,56	5,4	8,45	8,97	4,06	30
	4	3,15	4,64	6,85	7,75	3,52	3,6	4,65	6,73	4,64	3,44	30
	5	2,8	3,39	6,01	6,62	2,68	2,59	3,03	5,82	6,32	2,77	28
	6	2,21	Membro deformado	3,52	4,86	0,97	1,83	Membro deformado	2,98	5,03	1,65	26

Tabela 18 – Teste estatístico da média dos tamanhos entre as medidas do lado esquerdo e direito nos grupos controles e tratados de cada tratamento.

(continua)

Tratamento ($\mu\text{L/mL}$)	Variável	Teste estatístico	Valor t ou z	p
83,3	Membro superior esquerdo	t	0,011	0,991
	Membro superior direito	t	-0,3804	0,708
	Membro inferior esquerdo	t	-0,035	0,973
	Membro inferior direito	t	0,557	0,584
	Tronco	t	0,47	0,651
	Cabeça	t	1,192	0,268
	Olho esquerdo	M-W	-0,193	0,847
	Olho direito	M-W	-0,733	0,464
93,3	Membro superior esquerdo	t	-0,843	0,412
	Membro superior direito	t	-0,645	0,528
	Membro inferior esquerdo	t	-0,906	0,378
	Membro inferior direito	t	0,23365	0,818
	Tronco	t	-0,893	0,3848
	Cabeça	M-W	-0,453	0,651

Tabela 18 – Teste estatístico da média dos tamanhos entre as medidas do lado esquerdo e direito nos grupos controles e tratados de cada tratamento.

(conclusão)

Tratamento ($\mu\text{L/mL}$)	Variável	Teste estatístico	Valor t ou z	p
93,3	Olho esquerdo	M-W	-0,952	0,341
	Olho direito	M-W	-1,994	0,0462*
100	Membro superior esquerdo	t	1,631	0,137
	Membro superior direito	t	2,011	0,0753
	Membro inferior esquerdo	t	1,227	0,255
	Membro inferior direito	t	1,737	0,121
	Tronco	M-W	-0,733	0,464
	Cabeça	M-W	-1,389	0,165
	Olho esquerdo	t	1,539	0,158
	Olho direito	t	1,797	0,106

t – Teste t;

M-W – Mann-Whitney;

* - apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 19 – Assimetrias entre as medidas do lado esquerdo e direito nos grupos controles e tratados de cada tratamento.

	83,3 µL/mL						93,3 µL/mL						100 µL/mL					
	Membro superior		Membro inferior		Olho		Membro superior		Membro inferior		Olho		Membro superior		Membro inferior		Olho	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Módulo	0,43	0,28	0,62	0,66	0,06	0,33	0,05	0,43	1,03	0,35	0,06	0,09	0,04	0,24	0,26	0,56	0,37	0,38
	1,03	0,25	0,33	0,59	1,02	0,12	0,06	0,33	0,1	0,28	0,24	0,2	0,3	0,45	0,18	0,1	0,26	0,14
	0,33	0,23	1,02	0,15	0,2	0,2	0,19	0,25	1,55	1,87	0,09	0,07	0,02	0,52	0,56	0,23	0,4	0,21
	0,12	0,09	0,01	0,71	0,12	0,04	0,04	0,46	1,55	2,19	0,03	0,01	0,02	0,45	0,44	0,01	0,12	0,08
	0,04	0,39	0,16	0,76	0,01	0,06	0,24	0,05	0,22	1,33	0,23	0,17	0,04	0,21	0,84	0,36	0,13	0,09
	0,04	0,17	0,79	0,28	0,14	0,15	0,21	0,45	1,11	0,3	0,11	0,01		0,38				0,68
	0,25	0,45	0,06	0,24	0,1	0	0,21	0,4	0,37	0,04	0,1	0,32						
	0,14	0,43	1,5	1,21	0,12	0,14	0,23		0,65		0,12							
	0,41		1,29		0,6		0,05		1		0,37							
	0,52		0,21		0,01		0,18		0,25		0,12							
	0,25		1,97		0,16		0,03		0,6		0,1							
	0,85				0,05													
Média	0,3675	0,2863	0,7236	0,5750	0,2158	0,1300	0,1355	0,3386	0,7664	0,9086	0,1427	0,1243	0,0840	0,3750	0,4560	0,2520	0,2560	0,2633
Desvio padrão	0,3100	0,1281	0,6532	0,3470	0,2972	0,1038	0,0874	0,1475	0,5175	0,8733	0,0984	0,1128	0,1212	0,1247	0,2613	0,2172	0,1305	0,2319

C – Grupo controle;

T – Grupo tratado.

Tabela 20 – Teste estatístico da média das assimetrias entre as medidas do lado esquerdo e direito nos grupos controles e tratados de cada tratamento.

Tratamento ($\mu\text{L/mL}$)	Variável	Teste estatístico	Valor t ou z	p
83,3	Membro superior	t	0,698	0,494
	Membro inferior	t	0,584	0,567
	Olho	M-W	-0,077	0,938
93,3	Membro superior	M-W	-2,724	<0,001*
	Membro inferior	t	-0,437	0,668
	Olho	M-W	-0,091	0,4961
100	Membro superior	M-W	-2,298	0,0216*
	Membro inferior	t	1,342	0,216
	Olho	t	-0,0626	0,954

t – Teste t;

M-W – Mann-Whitney;

* - apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 21 – Teste estatístico entre os estágios nos grupos controles e tratados de cada tratamento.

Tratamento ($\mu\text{L/mL}$)	Teste estatístico	Valor z	p
83,3	M-W	-0,688	0,492
93,3	M-W	-1,253	0,21
100	M-W	-0,476	0,634

M-W – Mann-Whitney.